

УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ
ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ
СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ**

Министерство высшего и среднего специального образования
Латвийской ССР
Латвийский ордена Трудового Красного Знамени
государственный университет имени Петра Стучки
Кафедра физиологии растений
и микробиологии

Ученые записки
Латвийского государственного университета
имени Петра Стучки
том 145

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И
ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Редакционно-издательский отдел ЛГУ им. Петра Стучки
Рига 1972

УДК 576.809.53.

В настоящем сборнике представлены оригинальные данные о превращении внеклеточных природных пуриновых и пиримидиновых соединений под влиянием развивающихся микроорганизмов.

Работа предназначена для микробиологов, биохимиков и студентов старших курсов факультетов биологического профиля.

v. 694-19-72

20002.3644



П Р Е Д И С Л О В И Е

Проблема использования и микробиологической трансформации пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами интересна не только с точки зрения круговорота углерода, азота и фосфора в природе. Эти исследования открывают новые закономерности обмена пуриновых и пиримидиновых соединений в клетке. В частности, изучение трансформации аналогов пурина и пиримидина, среди которых найдено большое число химиотерапевтических средств (антибактериальные, противовирусные, канцеростатические, гербициды), дает представление о механизме воздействия и биохимических превращениях этих соединений в клетке. Исследования в этом направлении в будущем могут привести к новым промышленным методам получения дорогостоящих производных пурина и пиримидина.

В настоящем сборнике отражена часть научных данных, полученных на кафедре физиологии растений и микробиологии ЛГУ им.П.Стучки в течение последних двух лет.

Свои отзывы, замечания, пожелания, возникшие при ознакомлении с нашими работами, просим адресовать кафедре физиологии растений и микробиологии Латвийского ордена Трудового Красного Знамени государственного университета им.П.Стучки.

Редколлегия

М. Я. Витол, О. А. Офкант

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКОБАКТЕРИЙ,
ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ПРИРОДНЫЕ ПИРИМИДИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ
ЕДИНСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА ОРГАНИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ

Микроорганизмы, использующие природные пириимидиновые основания (ППО) в качестве единственного источника углеродного и азотного питания, сыграли ведущую роль при изучении окислительного катаболизма пириимидиновых оснований в бактериях /1, 2, 3, 4, 5, 6, 7/. Из почвы и водоемов нами выделено более 150 штаммов бактерий, способных использовать урацил, тимий либо цитозин в качестве единственного источника углеродного и азотного питания. Все они принадлежат к одному виду. По определителю Красильникова /8/ эти бактерии нами отнесены к микобактериям, свойства которых описаны ранее /9/.

Некоторыми исследователями в аналогических условиях выделенные бактерии отнесены по определителю Берджи /10/ к *Mycardia corallina* /4, II/. Однако, насколько удается судить по весьма краткому описанию выделенных в различных лабораториях активных культур, они весьма сходны по своим морфологическим и физиологическим свойствам, и не исключено, что они принадлежат к одному виду.

Хотя с бактериями, использующими ППО в качестве единственного источника органического питания, проведено много исследований по изучению катаболизма пириимидиновых структур, их физиологические свойства исследованы недостаточно.

М е т о д и к а

Микобактерии выращивались на основе синтетической среды следующего состава:

Основа среды А.

K_2HPO_4	-	0,27%
KH_2PO_4	-	0,12%
$NaCl$	-	0,01%

$MgCl_2 \cdot 7H_2O$ - 0,003%

$FeCl_3$ - 0,001%

Смесь микроэлементов *

К основе среды добавлялись источники углеродного и азотного питания в концентрациях, указанных ниже. В случае проверки возможности использования различных аминокислот в качестве единственных источников углеродного и азотного питания к основе синтетической среды А добавлялись аминокислоты в концентрации 0,3%. В средах устанавливалось pH 7,2 при помощи разведенных растворов NaOH и HCl и разливались в колбах Эрленмейера объемом 250 мл по 30 мл.

Стерилизация проводилась при 0,5 атм 30 мин. Среда, содержащие углеводы, нуклеозиды, нуклеотиды, дигидропириимидины, мочевины, барбитуровую и 5-метилбарбитуровую кислоты стерилизовали фильтрацией через бактериологические фильтры.

В качестве посевного материала использовали 24 часовую культуру бактерий, выращенную на МПА. Культура добавлялась к питательным средам в виде водной суспензии из расчета

5 мг клеток по сухому весу на литр среды. Инкубацию проводили при 28° в условиях принудительной аэрации на качалках, работающих в режиме 150 об/мин. Во время развития бактерий периодически отбирались пробы для анализа. Прирост биомассы определялся нефелометрически. Пересчет на сухой вес биомассы осуществлялся при помощи стандартной кривой, pH определялось потенциометрически. В опытах использовались тщательно проверенные очищенные соединения.

Все опыты проводились с тремя штаммами микробактерий - *Mycobacterium* sp. 47 (выделенным из почвы на среде с урацилом), *Mycobacterium* sp. 4 (выделенным из речной воды на среде с тимином) и *Mycobacterium* sp. 12 (выделенным из почвы на среде с цитозином). В связи с тем, что штаммы по своим физиологическим свойствам принципиального различия не имели, приводим только экспериментальные данные, полученные со штаммом *Mycobacterium* sp. 47.

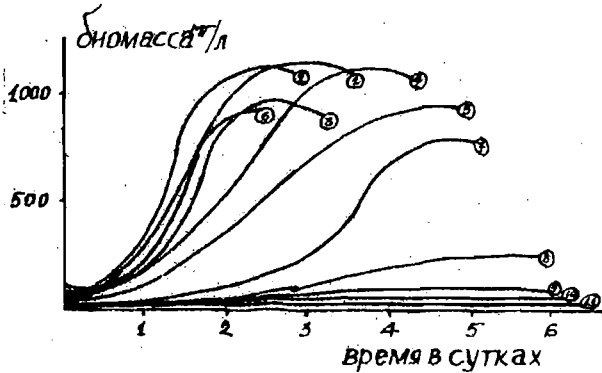
* Смесь микроэлементов содержала следующие ионы: Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , MoO_4^{2-} , VO_3^{3-} .

Результаты и их обсуждение

В ранних исследованиях выяснена роль витаминов на развитие культуры, использующей урацил в качестве основного источника питания (II). *Mycobacterium* sp. 47 развивается на средах без введения витаминов. Она хорошо использует многие углеводы, органические кислоты, а также глицерин. Развитие бактерий на средах, содержащих некоторые из указанных соединений, показано на рис. I.

Рис. I.

Развитие *Mycobacterium* sp. 47 на средах с различными источниками углерода.



Основа среды А + 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +

- I сукцинат
- 2 фурмат
- 3 лактат
- 4 цитрат
- 5 пируват
- 6 глюкоза
- 7 глицерин
- 9 малонат
- 10 формиат

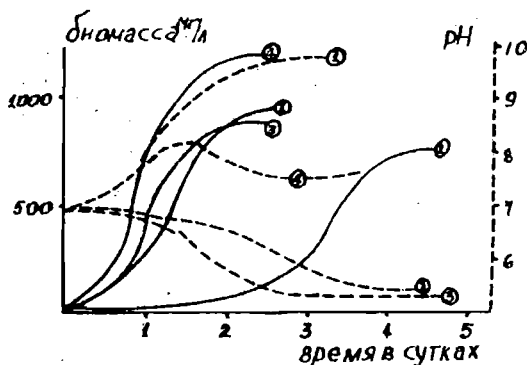
II сукцинат 1,5%

0,5%

Быстро употребляются, обеспечивая хороший рост, глюкоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза, маннит. Такой же хороший рост обеспечивают среды, содержащие соли органических кислот. Быстрый рост проявляется на средах с сукцинатам, малатом, фумаратом, лактатом. Незначительно хуже используются цитрат и пируват, слабо используется ацетат, не используются формиат, оксалат, тартрат, малонат. Не используются метиловый, этиловый и бутиловый спирты. Глицерин употребляется хорошо, однако на средах, содержащих глицерин в качестве единственного источника углеродного питания наблюдается значительная задержка развития микроорганизмов в начальной фазе, а так же сильное неблагоприятное подкисление среды, что позже в свою очередь отрицательно отражается на жизнедеятельности бактерий.

Рис. 2

Развитие *Mycobacterium* sp. 47 на различных средах и изменение pH среды



Основа среды А + 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +

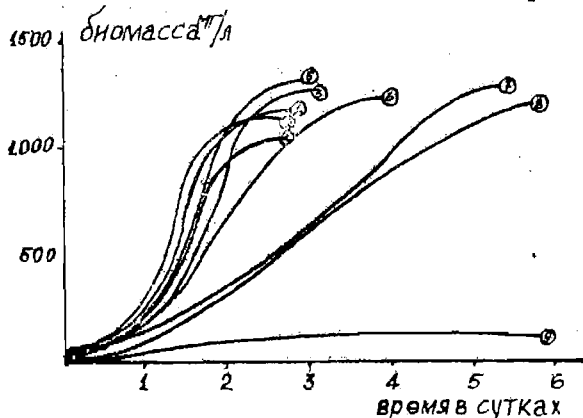
- 1 сукцинат 0,4%
- 2 глицерин 0,4%
- 3 глюкоза 0,4%
- 4 сукцинат 0,1% + глицерин 0,4%.

Они лучше переносят сдвиги реакции в щелочную сторону (развития еще возможно при pH 9-9,5), чем в кислую сторону

(развитие приостанавливается при pH 5,8-6,0). При росте на средах, содержащих соли органических кислот, бактерии сильно подщелачивают их, при развитии на средах с глюкозой или глицерином - сильно подкисляют среду (рис. 2). В связи с этим, одновременно с добавлением в среду глицерина и сукцината в различных соотношениях можно управлять сдвигами pH среды во время культивирования микроорганизмов. При концентрациях выше 1% многие соли органических кислот больше не обеспечивают развития микроорганизмов. Так сукцинат в концентрации 1,5% не используется в качестве единственного источника углеродного питания (рис. 1). Максимальная концентрация сукцината, обеспечивающая развитие микобактерий, зависит от источника азотного питания. При комбинации с некоторыми источниками азотного питания, например, при замене $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 5-бромурацил (в концентрации - 0,1%), сукцинат в качестве единственного источника углеродного питания в концентрациях выше 0,6% не поддерживает рост бактерий.

Рис. 3

Развитие *Mycobacterium* sp. 47 на средах с различными источниками азота (в концентрации 0,1%)



Основа среды А + 0,1% сукцинат + 0,4% глицерин +	
1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 аспарагин
2 KNO_3	7 оротовая кислота
3 NH_4NO_3	8 5-хлорурацил
4 урацил	9 уридин
5 мочевины	

При изучении возможности использования различных источников азотного питания в качестве источников углерода, использовалась комбинация сукцината с глицерином. Результаты опытов представлены на рис. 3. Культура хорошо использует в качестве источника азота нитраты, аммонийные соли, а также различные органические источники азота как аминокислоты, так и пуриновые и пиримидиновые соединения. Многие аминокислоты могут использоваться культурой даже в качестве единственного источника как углеродного, так и азотного питания (см. табл. 1). Возможность использования различных производных пурина и пиримидина представлена в таблице 2.

Таблица 1

Развитие бактерий на средах с различными α - аминокислотами в качестве источниками C и N

Соединение	Развитие бактерий	Соединение	Развитие бактерий
L -аргинин	хорошее	DL -аспарагино- вая кислота	среднее
L -аспарагин	хорошее	Глицин	
DL - валин	хорошее	DL -метионин	
DL -лейцин	хорошее	DL -пролин	
DL -изолейцин	хорошее	DL -серин	
DL -фенилаланин	хорошее	DL -треонин	нет развития
L -гистидин	хорошее	DL -триптофан	
DL -аланин	среднее	L -цистин	
DL -тирозин	среднее		

Развитие проверялось на основе синтетической среды А + 0,3% аминокислоты.

Данные о развитии *Mycobacterium* sp.47, обследованных на синтетических средах, указывают на широкую возможность использования различных простых и сложных источников как углеродного, так и азотного питания. Для создания более благоприятного pH среды во время развития бактерий нами была использована в качестве углеродного источника питания комбинация сукцината с глицерином. Выявлена обширная

Таблица 2

Использование пуриновых и пиримидиновых производных
в качестве источников питания

Соединения	Биомасса (мг/л) *			
	Соединения как источники С и N **		Соединения как источники N ***	
	Через 24 часа инкубации	Через 72 часа инкубации	Через 24 часа инкубации	Через 72 часа инкубации
I	2	3	4	5
<u>Пуриновые и пиримидиновые основания</u>				
Урацил	40	230	430	1430
Тимин	85	280	500	1500
Цитозин	24	85	810	1520
Аденин	-	-	456	1213
Гуанин	-	-	358	1283
<u>Дигидропиримидины</u>				
5,6-дигидроурацил	0	0	0	0
5,6-дигидрооротовая кислота	0	0	0	0
5,6-дигидротимин	0	0	0	0
<u>5-галогенурацилы</u>				
5-Br -урацил	0	0	10	14
5-Cl -урацил	0	0	43	621
5-J -урацил	0	0	30	83
5-F -урацил	0	0	62	583
<u>Нуклеозиды и дезоксирибонуклеозиды</u>				
Уридин	0	0	0	0
Цитидин	0	0	56	912
Аденозин	0	0	81	712
Гуанозин	0	0	32	156

* Данные коррелированы по отношению вносимого посевного материала

I	2	3	4	5
Инозин	0	0	0	0
Дезокситимин (тимидин)	0	0	0	0
<u>Нуклеотиды</u>				
Уридин-5'-монофосфат	0	0	0	0
Цитидин-5'-монофосфат	0	0	0	0
Аденозин-5'-монофосфат	0	0	0	0
Гуанозин-5'-монофосфат	0	0	0	0
Инозин-5'-монофосфат	0	0	0	0
<u>Пуринил и пириmidил-аминокислоты</u>				
β -(урацил- N_1)- α -аланин (вилларфин)	0	0	58	I332
β -(2-амино-пириmidил- C_4)- α -аланин (латирин)	0	0	69	III6
β -(урацил- C_4)- α -аланин	0	0	51	92I
β -(урацил- C_5)- α -аланин	0	0	83	I2I3
β -(аденин- C_9)- α -аланин	0	0	56	I063
β -(гипоксантил- C_9)- α -аланин	0	0	91	I312
<u>Высокомолекулярные соединения</u>				
РНК	0	0	0	0
ДНК	0	0	0	0
<u>Другие пуриновые и пириmidиновые соединения</u>				
Оротовая кислота	0	0	41	312
Барбитуровая к-та	32	I35	81	I315
5-метилбарбитуровая к-та	26	I81	56	I212
Ксантин	0	0	26	I35
Гипоксантин	0	0	18	106

Состав сред. ** Основа среды А
+ пуриновое или пириmidиновое производное
в концентрации 0,3%.

*** Основа среды А +

- 0, 1% янтарная кислота
- 0, 5% глицерин
- 0, 1% пуриновое или пиримидиновое производное.

возможность использования пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве источников азотного питания. Интересно, что проверенные культуры микобактерий не способны использовать в качестве источника питания малонувую кислоту /4/. Хотя доказано, что в результате катаболизма 5-метилурацила образуется метилмалоновая кислота /5/, катаболизм урацила через стадию свободной малоновой кислоты все еще вызывает сомнения /4/. Интерес представляет также тот факт, что культура не способна использовать пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды. Это, вероятно, связано с неспособностью отщеплять от нуклеотидов остаток фосфорной кислоты, так как некоторые аналогичные соединения на уровне нуклеозидов доступны культурам в качестве источников азотного питания. Однако пуриновые или пиримидиновые нуклеозиды, не содержащие в гетероцикле свободных аминогрупп, также недоступны для микобактерий в качестве источников азотного питания, хотя соответствующие свободные основания используются сравнительно легко. Все указанные физиологические особенности могут быть объяснены отсутствием у выделенных бактерий фосфатазной и нуклеозидной активности по отношению экзогенных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов. Не исключено, что определенную роль в отсутствии способности использования нуклеотидов и нуклеозидов играет также процесс проникновения этих соединений внутри бактерий. Выяснение этих вопросов требует еще дополнительных физиологических и биохимических исследований.

В ы в о д ы

1. *Mycobacterium* sp. 47b в качестве источников углеродного питания эффективно используют соли органических кислот, различные углеводы, глицерин.
2. В качестве источника азотного питания используются аммонийные соли, нитраты, различные аминокислоты и природные и синтетические производные пурина и пиримидина.

Л и т е р а т у р а

1. Nayaishi O., Kornberg A. Enzymatic formation of barbituric acid from uracil and 5-methylbarbituric acid from thymine. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 2975.
2. Lara F.I.S. On the decomposition of pyrimidines by bacteria I Studies by means of the technique of simultaneous adaptation. *J. Bact.* 1952, 64, 271.
3. Lara F.I.S. On the decomposition of pyrimidines by bacteria. II Studies with cell-free enzyme preparations. *J. Bact.* 1952, 64, 279.
4. Baat R.D., Woods D.D. Decomposition of pyrimidines by *Nocardia corallina*. *J. Gen. Microbiol.* 1961, 24, 207.
5. Biggs H.G., Doumas B. Oxidative catabolism of thymine. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2470.
6. М.Я. Витол, В.Н. Шапошников, М.Э. Дунце, Ю.П. Швачкин. О химической структуре продуктов трансформации природных пиримидиновых оснований и 5-галогенурацилов микобактериями. *МГС*, 1968, № 2, 348.
7. М.Я. Витол, В.Н. Шапошников, Ю.П. Швачкин. Новый путь катаболизма оротовой кислоты у микроорганизмов. *ДАН СССР* 1967, 174, 1202.
8. Н.А. Красильников. Определитель бактерий и актиномицетов. М.-Л., 1949.

9. М.А.Витол, Б.О.Яновская. Выделение и характеристика аэробных почвенных микроорганизмов, использующих природные пиримидиновые основания в качестве единственного источника углеродного и азотного питания. Вопросы биологии, изд. "Зинатне", Рига, 1969, 131.
10. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. 1957.
11. Martin I.K., Batt K.D. Studies on the nutrition of carollina. J.Bact. 1957, 74, 225.

ПАРАЛЛЕЛЬНЫЕ ПУТИ КАТАБОЛИЗМА УРАЦИЛА МИКОБАКТЕРИЯМИ

Известно, что урацил в клетках животных, растений и некоторых бактерий разрушается восстановительным путем через стадию дигидроурацила и β -уреидопропионовой кислоты /1/. Однако у некоторых штаммов микроорганизмов из родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Nocardia* до сих пор известен только окислительный путь катаболизма урацила, осуществляющийся через стадию барбитуровой кислоты и мочевины /1, 2/. В этой работе приведены данные о превращении урацила в микобактериях параллельными путями — как через стадию барбитуровой кислоты и мочевины, так и через стадию дигидроурацила и β -уреидопропионовую кислоту.

В экспериментах использовался ранее выделенный и изученный штамм микроорганизма *Mycobacterium* sp. 47, способный использовать природные пиримидиновые основания в качестве единственного источника углеродного и азотного питания /3/.

М е т о д и к а

Для выращивания микроорганизмов применяли основу синтетической среды Б, содержащую низкий минеральный фон:

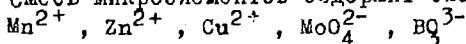
KH_2PO_4	-	0,1%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	0,003%
FeCl_3	-	0,001%
Смесь микроэлементов*		

(или дрожжевой автолизат 0,01%)

К основе среды Б добавлялось пиримидиновое соединение — в количестве 0,1 — 0,5%. Исходное pH среды при помощи NaOH или HCl устанавливали в пределах 7-7,2.

Среду стерилизовали в течение 30 мин. при 0,5 атм

* Смесь микроэлементов содержит следующие ионы:



В качестве посевного материала использовали суточную культуру микробактерий, выращенную на МПА, добавляемого из расчета 5 мг на 1 литр среды (по сухому весу бактерий). Среды наливались в колбы Эрленмейера емкостью 250 мл по 50 мл, которые помещались на качалках, работающих в режиме 150 об/мин. Во время ферментации из колб периодически отбирались пробы для анализа. Прирост биомассы контролировали нефелометрически и по стандартной кривой полученные данные помутнения среды пересчитывали на сухой вес клеток. рН определяли потенциометрически. Изменения в химическом составе культуральной жидкости определяли при помощи количественной и качественной бумажной хроматографии следующим образом. В каждой пробе бактерии отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость исследовали при помощи восходящей бумажной хроматографии. В случае препаративного выделения трансформированных соединений, культуральную жидкость (обычно 1000 мл), осторожно нейтрализовали при помощи NaOH или HCl, и концентрировали до объема 5-6 мл в вакуумном испарителе при температуре 40°, при этом поддерживая нейтральную реакцию среды осторожным добавлением NaOH или HCl. Жидкую фракцию декантировали и подвергали препаративному бумажно-хроматографическому разделению в системе изопропанол-вода в соотношении 7:3. Для более четкого разделения соединений хроматографировали трижды. Выявив полосы распределения соединений, вырезали их и соединения элюировали водой. Элюат концентрировали в вакууме и соединения очищались перехроматографированием в системе этилацетат: ледяная уксусная кислота: вода в соотношении 3:1:1. После повторной очистки соединения снова элюировались, элюат концентрировали и использовали для дальнейших анализов.

Пиримидиновые соединения, обладающие интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра, выявлялись на хроматограммах и электрофореограммах при помощи ультрамикроскопа /6/. Соединения, содержащие свободную уреидную группировку, и дигидропиримидины (предварительно подвергая расщеплению щелочным раствором) проявляли подкисленным раствором парадиметиламинобензальдегида /5/.

Химическая структура выделенных соединений устанавливалась путем прямого сравнения с образцами свидетелей заведомо известной структуры.

Количественное определение пиримидиновых соединений, после предварительного хроматографического разделения, проводили на спектрофотометре СФ-4А при рН 11 в области спектра характеризующимся у данного соединения максимальным поглощением. Пиримидиновые соединения предварительно элировали с хроматограмм водой в течение 24 часов. Пересчет на весовые количества осуществлялся по стандартной кривой, построенной при помощи химически чистых пиримидиновых соединений.

Электрофоретические подвижности определяли при напряжении 400 в, продолжительность электрофореза варьировали в зависимости от подвижности разделяемых соединений в пределах от 1,5 до 5 часов.

Для получения бесклеточных экстрактов микобактерий, развитие микроорганизмов прекращали во второй половине логарифмической фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием и дважды промывали 0,1 М фосфатным буфером рН 7,2 и растирали 30 мин. с порошком Al_2O_3 . Ферменты экстрагировали фосфатным буфером этого же состава и освобождали от неразрушенных клеток и окиси алюминия центрифугированием 30 мин при 3000 об/мин. Полученный ферментный экстракт разводили буфером из расчета 4 мг белка на 1 мл раствора (по Лоури), который использовали для инкубации с субстратом. Все операции по получению ферментного раствора проводили при $t +4^{\circ}C$.

Инкубацию ферментного экстракта с субстратом проводили 30 мин в аэробных условиях при $t +30^{\circ}$ по С. Для этого к 2 мл ферментного раствора добавляли 2 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 0,2% концентрации субстрата.

Результаты и их
обсуждения

Mycobacterium sp. 47 хорошо развивается на средах с умеренными концентрациями урацила, используя последние в качестве основного источника как углеродного, так и азотистого

694-19-72

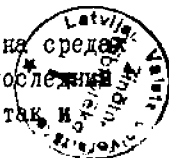
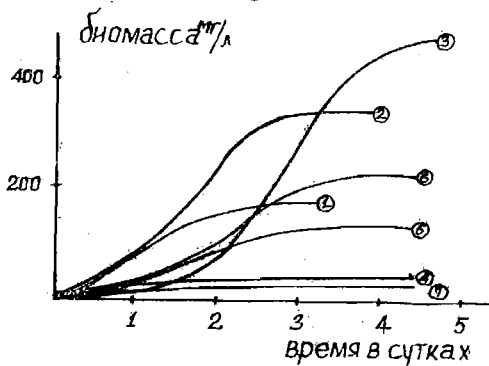


Рис. I.

Развитие *Mycobacterium* sp.47 на средах с урацилом и барбитуровой кислотой



Основа синтетической среды Б +

1	урацил	0,1%
2	"	0,2%
3	"	0,3%
4	"	0,5%
5	барбитуровая кислота	0,1%
6	"	0,2%
7	"	0,3%

азотного питания (рис. I). При концентрации урацила 0,3% появляется временная задержка развития бактерий, а при концентрации выше 0,4% урацил уже не обеспечивает рост культуры.

Mycobacterium sp. 47 хорошо развивается при замене в среде урацила на барбитуровую кислоту в концентрациях 0,1 - 0,2%. Во время использования урацила в культуральной жидкости обнаружено накопление четырех новых соединений обозначенных как A_1 , A_2 , A_3 и A_4 . Во время развития микобактерий на среде с барбитуровой кислотой в среде накапливается только соединение A_2 .

При инкубации урацила с ферментным экстрактом бактерий в небольших количествах обнаружено накопление соединений A_3 и A_4 , а при инкубации в аналогичных условиях дигидроурацила,

дигидроурацил почти полностью исчезает и накапливается соединение A_4 (см. табл. I).

Таблица I

Продукты, накапливающиеся при инкубации субстрата с экстрактом микобактерий

Субстрат	Обнаруживаемые новые соединения	Примечания
Урацил	A_3 и A_4	A_3 и A_4 обнаруживаются в следовых количествах
Дигидроурацил	A_4	Полное исчезновение дигидроурацила, накопление соединения A_4 в больших количествах
Ферментный экстракт без субстрата	A_3 и A_4 не обнаружены	
Субстрат без добавления фермента	A_3 и A_4 не обнаружены	

Соединение A_1 обладает поглощением в ближних УФ лучах. Соединения A_2 , A_3 и A_4 обнаружены по положительной желтой реакции, возникающей после опрыскивания хроматограмм и электрофореограмм подкисленным раствором п-диметиламинобензальдегидом, причем соединение A_3 дает эту реакцию только после предварительной обработки хроматограммы 0,5 N раствором NaOH.

Соединения A_1 и A_2 обнаруживаются в культуральной жидкости сравнительно легко. Они появляются сразу же после начала развития бактерий. В логарифмической фазе развития культуры концентрации соединений A_1 и A_2 достигают значительных величин, однако после использования урацила, связанного с наступлением стационарной фазы развития бактерий, соединения A_1 и A_2 практически из среды исчезают. Концен-

трации соединений A_3 и A_4 незначительны и их трудно обнаружить путем прямого хроматографического разделения концентрированной но нефракционированной культуральной жидкости.

Легче всего соединения A_3 и A_4 обнаруживаются в конце логарифмической фазы развития микобактерий или даже в начале наступления стационарной фазы. Препаративное выделение в количествах, необходимых для определения их некоторых физико-химических величин, осуществлялось из 1000 мл культуральной жидкости, взятой в начале наступления стационарной фазы. При этом *Mycobacterium* sp. 47 выращивалась на синтетической среде, содержащей 0,2% урацила.

Изучение некоторых физико-химических констант выделенных соединений (табл. 2) позволило идентифицировать соединения A_1 как барбитуровую кислоту, соединение A_2 как мочевины, соединение A_3 как дигидроурацил и соединение A_4 как β -уреидопропионовую кислоту.

Барбитуровая кислота и мочевина как промежуточные продукты распада урацила в микроорганизмах, использующих урацил в качестве единственных источников углеродного и азотного питания, уже хорошо известны [2, 4]. Американские ученые Бат и Вууд, на основе точных количественных исследований процесса распада урацила под влиянием *Mycardia carollina*, высказали предположение, что у этих бактерий кроме окислительного пути возможен еще другой путь катаболизма урацила. Однако параллельный распад, осуществляющийся через стадию дигидроурацила, был отклонен на той основе, что ни дигидроурацил, ни β -уреидопропионовая кислота не могут служить у изученных бактерий даже источником азотного питания. Вопрос с точки зрения проницаемости этих соединений в бактерии не рассматривался. Установленные и выделенные в наших экспериментах соединения дигидроурацил и β -уреидопропионовая кислота являются продуктами распада урацила. На это указывают не только данные, полученные в экспериментах с развивающимися клетками, но также опыты с ферментами микобактерий. Таким образом, катаболизм урацила под влиянием *Mycobacterium* sp. 47 осуществляется по следующей схеме:

Таблица 2

Некоторые константы урацила и продуктов его трансформации

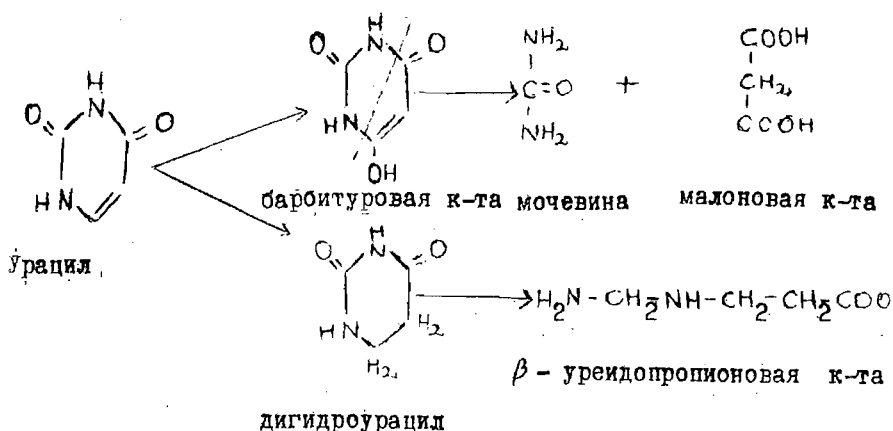
Соединение	R_T в системе					$ЭП \times 10^5$ $см^2 \cdot в^{-1} \cdot сек^{-1}$		УФ поглощение (нм)			
	I	2	3	4	5	рН 1,4*	рН 9,2**	рН I		рН II	
								max	min	max	min
Урацил	0,57	-	0,61	0,60	0,35	-	+4,1	259	227	234	241
Барбитуровая к-та + A_1	0,50	0,42	0,28	0,51	0,38	+2,94	+4,1	256	236	259	240
Мочевина + A_2	0,82	0,66	0,67	0,66	0,30	0	-0,91	-	-	-	-
Дигидроурацил + A_3	0,73	0,67	0,67	0,70	0,32	-1,12	-0,45	-	-	230	-
β -уреидопропионовая кислота + A_4	0,53	0,60	0,70	0,80	0	-0,86	+6,80	-	-	-	-

Системы:

1. Изопропанол - NH_4OH (насыщенный H_2O раствор) - вода 14:1:5
2. Изопропанол - вода 7:3
3. Этилацетат - ледяная уксусная кислота - вода 2:1:1
4. Н-бутанол - ледяная уксусная кислота - вода 2:1:1
5. Н-бутанол насыщенный водой

* 30 % уксусная кислота

** 0,05 M боратный буфер



В ы в о д ы

1. *Mycobacterium* sp. 47 может использовать урацил и барбитуровую кислоту в качестве единственного источника углерода и азота.
2. Микобактерии осуществляют катаболизм урацила по окислительному и восстановительному пути.

Л и т е р а т у р а

1. M. Luckner, C. Wasternack. Über neue Arbeiten zur Biosynthese N-heterocyclischer Verbindungen. VII. Bildung und Abbau von Verbindungen mit Pyrimidinring-system. Die Pharmazie, 1967, N 4, 181.
2. И. С. Звагинцева, М. Я. Витол, Ю. П. Швачкин, Г. К. Скрябин. Микробиологическая трансформация производных пириимидина. Микробиологический синтез, 1968, Np. 4, 8.

3. М.Я.Витол. Некоторые физиологические свойства **микробактерий**, использующих природные пиримидиновые основания с качестве освного источника питания. В настоящем сборнике.
4. М.Я.Витол, В.Н.Шапошников, Ю.П.Швачкин. Новый путь катаболизма оротовой кислоты у микроорганизмов ДАН СССР 1967, 174, № 5, 1202.
5. R.M.Fink, R.E.Cline, Mc Gauphey, K.Fink. Chromatography of pyrimidine reduction products. Anal.Chem., 1956, 28, 4.
6. Е.М.Блумберг. Прибор для хроматографии и химического анализа в ультрафиолетовых лучах (ультрахемископ). ДАН СССР, 1950, 72, 885.

В.П. Швачкин, М.Я. Витол, И.К. Шпрунка,
Л.А. Армалис, А.Я. Лишман

ОБРАЗОВАНИЕ 5-ОКСИМЕТИЛПИРИМИДИНОВ ПРИ
ТРАНСФОРМАЦИИ β -ПИРИМИДИЛ-5/АЛАНИНОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ
РОДА *Mycobacterium*.

В ходе изыскания новых биологически активных веществ нами получен ряд DL - β -/пиримидил-5/- α -аланинов /1-2/, сочетающих в одной молекуле характерные черты пиримидиновых оснований и β -замещенных аланинов как в структурном аспекте так и по реакционной способности. Таким образом, само химическое строение названных соединений ставит вопрос, будут ли ферментные системы живых клеток, естественными субстратами которых являются природные пиримидиновые основания или α -аминокислоты, воздействовать на эти синтетические пиримидиламинокислоты. Особый интерес представляет изучение биохимических превращений DL - β -2-метил-4-аминопиримидил-5/-аланина и DL - β -2-метил-4-оксипиримидил-5/-аланина, содержащих пиримидиновые части молекулы, соответственно идентичные пиримидиновой части молекулы тиамина и ее антагониста - окситиамина. Одним из способов изучения процессов биохимических превращений является исследование микробиологической трансформации пиримидиламинокислот. Настоящая работа посвящена исследованию влияния β -/пиримидил-5/ аланинов на рост и развитие некоторых почвенных микобактерий изолированных на урацилсодержащих средах и обладающих способностью использовать природные пиримидиновые основания в качестве основных источников питания /3/. Бактерии выращивались на среде Д следующего состава:

KH_2PO_4	-	0,1%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0,003%
$FeCl_3$	-	0,001%
Дрожжевой автолизат	-	0,01%
Глицерин	-	0,4%

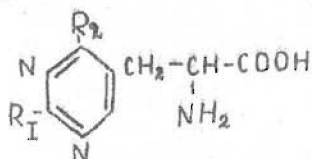
Янтарная кислота - 0,1%

К основе среды Д в качестве источника азотного питания добавлялась пириимидиламинокислота в концентрации 0,1%.

Исходное рН среды 7,2.

Выращивание бактерий, определение рН, биомассы, контроль за изменением химического состава среды, выделение и установление химического состава продуктов трансформации осуществлялось по описанной методике /4/.

В опытах использованы следующие рацемические пириимидиламинокислоты:



I $R_1 = R_2 = \text{OH}$; DL-β-урацилил-5-α-аланин;

II $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$ DL-β-2-метил-4-оксипириимидил-5-α-аланин;

III $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{NH}_2$; DL-β-2-метил-4-аминопириимидил-5-α-аланин;

IV $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{SH}$; DL-β-2-метил-4-меркаптопириимидил-5-α-аланин.

Результаты и их обсуждение

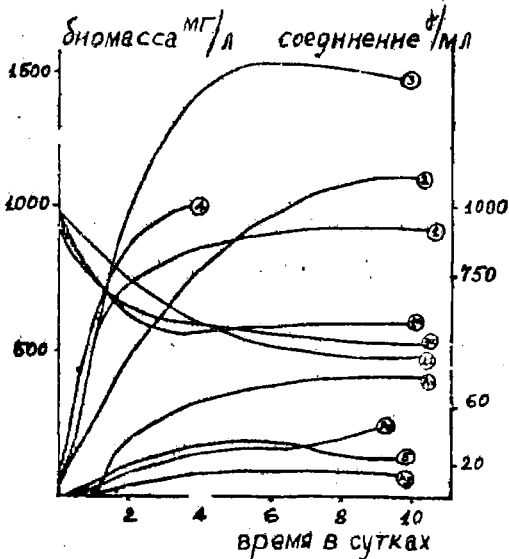
Опыты по трансформации DL-β-пириимидил-5-α-аланинов культурой *Mycobacterium sp. 100* проводились в условиях аналогичных ранее описанным по трансформации DL-β-пириимидил-N₃ / аланинов /5, 6/ и DL-β-пириимидил-4/аланинов /7/.

Mycobacterium sp. 100 хорошо использует DL-β-пириимидил-5-α-аланинов в качестве единственных источников азотного питания при наличии в среде дополнительных источников углеродного питания /рис. I/.

В результате проведенных опытов было установлено, что DL-β-урацил-5-α-аланин при инкубации с развивающейся культурой *Mycobacterium sp. 100* в культуральной жидкости

Рис. I

Изменения концентрации β -/пиримидил-5/- α -аланинов и 5-оксиметилпиримидинов в ходе развития *Mycobacterium sp. 100*.



Развитие бактерий на основе среды D +

1. DL - β - /4-окси-пиримидил-5/- α -аланин;
2. DL - β - /2-метил-4-окси-пиримидил-5/- α -аланин ;
3. DL - β - /2-метил-4-амино-пиримидил-5/- α -аланин ;
4. DL - β - /2-метил-4-меркапто-пиримидил-5/- α -аланин
5. контроль (без источника азота).

Изменения концентрации

- 1а. DL - β - /4-окси-пиримидил-5/- α -аланин ;
- 2а. DL - β - /2-метил-4-окси-пиримидил-5/- α -аланин ;
- 3а. DL - β - /2-метил-4-амино-пиримидил-5/- α -аланин ;

Накопление:

- A₁ 4-окси-5-оксиметилпиримидина
- A₂ 2-метил-4-окси-5-оксиметилпиримидина
- A₃ 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидина

регулярно обнаруживается новое вещества A_1 . Это вещество в отличие от исходной аминокислоты DL- β -7-урацил-5/- α -аланина, не дает положительной реакции с нингидрином, но обладает интенсивным поглощением в близкой УФ-области спектра.

Появление аналогичных веществ - A_2 и A_3 было отмечено в инкубатах при культивировании микобактерий на средах, содержащих DL- β -2-метил-4-оксипиримидил-5/- α -аланин и DL- β -2-метил-4-аминопиримидил-5/- α -аланин соответственно. Изучение хроматографических характеристик, электрофоретических подвижностей и УФ-спектров поглощения соединения A_1 позволило идентифицировать это вещество с известным 5-оксиметилурацилом, а соединения A_2 и A_3 оказались тождественными

2-метил-4-окси-5-оксиметилпиримидину и 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидину (табл. I).

Кроме соответствующих 5-оксипиримидиновых соединений во время ферментации соединений DL- β -7-урацил-5/- α -аланина, DL- β -2-метил-4-оксипиримидил-5/- α -аланина, DL- β -2-метил-4-аминопиримидил-5/- α -аланина и DL- β -2-метил-4-меркаптопиримидил-5/- α -аланина обнаружено накопление в среде целого ряда соединений, обладающих поглощением в близком УФ-области спектра. Количество этих веществ в инкубатах сильно меняется в зависимости от фазы роста культуры.

Природа соединений A_4 , A_5 , A_6 , которые накапливаются в результате микробиологической трансформации DL- β -2-метил-4-меркаптопиримидил-5/- α -аланина, не установлена, так как предполагаемые 4-меркаптопиримидины пока не описаны в литературе. Биологическое отщепление SH-группы с 4 положения пиримидинового кольца обнаружить не удалось и не исключено, что одно из неидентифицированных соединений (A_4 , A_5 или A_6) является соответствующим 2-метил-4-меркапто-5-оксиметилпиримидином.

На примере ферментации вилларидина было показано, что трансформации подвергается лишь L-форма рацемического соединения /5/. На том основании, что при выращивании *Mycobacterium sp.100* на средах с пиримидил-5-аланинами израсходуется как правило не больше половины внесенной аминокислоты, мы предполагаем, что в данном случае микроорганизмы также

Таблица I

Характеристика продуктов микробиологической трансформации
производных DL-β- /пириимидил-5/ аланина

Соединение	Rf в системе						ЭП × 10 ⁻⁵ см ² в ⁻¹ сек ⁻¹		УФ-поглощение макс		Наличие химической реакции
	I	2	3	4	5	6	Электро- лит А рН 1,4	Элек- тролит Б рН 10,5	λ макс рН 1,4	λ макс рН 10,5	
DL-β- /урацил-5/ -α- -аланин	0,27	0,15	0,21	0,09	0,31	0,03	-2,2	+0,5	255	285	+
DL-β- /2-метил-4-окси- пириимидил-5/ -α- -аланин	0,38	0,27	0,30	0,14	0,43	0,05	-3,5	+2,1	228, 260	232, 271	+
DL-β- /2-метил-4-ами- нопириимидил-5/ -α- -аланин	-0,48	0,31	0,32	0,09	0,47	0,05	-5,2	+1,2	247	235, 276	+
A ₁ + 5-оксиметилурацил	-0,53	0,66	0,52	0,28	0,53	0,26	-0,3	+1,3	263	291	-
A ₂ + 2-метил-4-окси-5- оксиметилпириимидин	-0,72	0,84	0,70	0,42	0,69	0,50	-3,4	+0,4	259	249	-
A ₃ + 2-метил-4-амино-5- оксиметилпириимидин	0,82	0,82	0,65	0,36	0,68	0,55	-7,5	+0,3	249	275	-
DL-β- /2-метил-4-мер- каптопириимидил-5/ -α- -аланин	-0,35	0,41	0,39	0,51	0,33	0,06	-1,1	+4,3	280	335	+
A ₄	-0,76	0,66	0,54	0,62	-	-	-4,7	-	-	-	-
A ₅	-0,68	0,68	0,67	0,69	-	-	-3,0	-	-	-	-
A ₆	-0,77	0,66	0,53	0,59	-	-	-3,4	-	-	-	-

Далее смотрите стр. 29.

- Система 1 Изопропанол - 25 % NH_4OH - H_2O / 4:1:5 / Электролит А - 30% уксусная к-та / рН 4 /
- Система 2 Изопропанол - H_2O / 7 : 3 / Электролит Б - 1,75 % водный раствор аммиака / рН 10,5 /
- Система 3 Этилацетат - CH_3COOH - H_2O / 3:1:1 /
- Система 4 Н.бутанол - HCOOH - H_2O / 77:13:10 /
- Система 5 Н.бутанол - CH_3COOH - H_2O / 2:1:1 /
- Система 6 Н.бутанол насыщенный H_2O

используют лишь один изомер из рацемата. Обнаруженное накопление 5-оксиметилпиримидиновых соединений, пиримидиновая часть у которых является аналогичной соответствующей исходной пиримидиламинокислоте, позволяет сделать вывод, что метаболизм β -/пиримидил-С₅/- α -аланинов начинается с превращением аланинового фрагмента молекулы. В некотором отношении β -/пиримидил-5/- α -аланиновые структуры можно рассматривать как аналоги природных аминокислот фенилаланина и гирозина.

Как известно, катаболизм этих природных аминокислот также осуществляется превращением аланинового фрагмента молекулы. Дегградация аланинового фрагмента молекулы до оксиметильного остатка обнаружена у гистидина /8/. На наш взгляд, особый интерес вызывает метаболизм β -/пиримидил-5/- α -аланинов, замещенных во втором положении пиримидинового цикла метильной группой. Это объясняется тем, что при трансформации β -/2-метил-4-аминопиримидил-5/- α -аланина образуются 2-метил-4-амино-5-оксаметилпиримидин, который является идентичным промежуточному продукту метаболизма витамина В₁ /9/. Возникающий в результате трансформации 2-метил-4-оксипиримидил/-аланина 2-метил-4-окси-5-оксиметилпиримидин в свою очередь также является идентичным пиримидиновым компонентом мощного антагониста тиамина В₁ - окситиамина.

Л и т е р а т у р а

1. Швачкин Д.П., Шпрунка И.К. Синтез пиримидинового аналога 2,4-диоксифенилаланина. Вестник МГУ. Хим.сер. 1961, № 6, 72.
2. Швачкин Д.П., Шпрунка И.К. Получение новых пиримидил-5-аланинов с кольцевой системой аналогичной пиримидиновому фрагменту тиамина. ЖОХ, 1965, № 12, 2251
3. Витол М.Я., Якобсон Б.О. Выделение и характеристика аэробных почвенных микроорганизмов, использующих природные пиримидиновые основания в качестве единственного источника углеродного и азотного питания. Сб. "Вопросы биологии", сб.статей

изд. "Зинатне", Рига, 1969, стр. 131.

4. М.Я.Витол. Параллельные пути катаболизма урацила микобактериями. В настоящем сборнике.
5. Ю.П.Швачкин, М.Я.Витол, В.Н.Шапошников, М.Ю.Лидак, М.Э.Дзене. О химической природе продуктов микробиологической трансформации виллардинна и его аналогов. Вестник ИГУ, Хим сер. 1967, № 6, 96.
6. M.Vitols, I.Schwatskin, M.Lidaks, Transformation of pyrimidylamino acids with Mycobacterium. Abstracts. In Fermentation advances in the light of recent theoretical progress in microbiology, biochemistry and engineering". Institute of Microbiology Rutgers, the State University New Brunswick NY, USA. Third International fermentation. Symp., September 2-6, 1968, USA .
7. Ю.П.Швачкин, Г.А.Коршунова, М.Э.Дунце, М.Я.Витол. О химической природе продуктов микробиологической трансформации латирина. ХГС, 1968, № 3, 559.
8. N.V.Thoi, P.E.Glahn, J.Hedegaard, P.Manchon, J.Roche. Sur un aspect nouveau du metabolisme de la L-Histidine. Bioch.Bioph.Acta, 1954, 15, 87.
9. Noel R.A. Bacterial Metabolism of Thiamine. I.The isolation and characterization of the initial intermediates in the oxydation of thiamine. J.Biol.chem., 1968, 243, 4534.

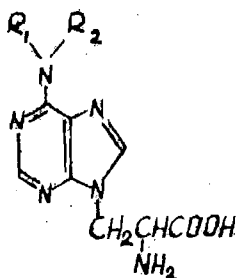
К.Я. Лишман, И.А. Раснац, М.Я. Витол,
Я.Я. Шлуке, М.Д. Лидак

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ β -/6-АМИНОПУРИНИЛ- N_9 - α -
АЛАНИНА МИКРООРГАНИЗМАМИ РОДА МИКОБАКТЕРИЙ

В последнее время широко развивают синтез пуририл- α -аминокислот, как в нашей стране /1, 2, 3/, так и в зарубежных лабораториях /4, 5/ с целью выявления потенциальных антимаболитов. Однако биохимические превращения этих структур до сих пор не известны.

Данной работой мы поставили себе цель изучить возможности использования и биохимического превращения некоторых из указанных соединений *Mycobacterium* sp. 100. Нами ранее сообщалось /6/, что микробиологическая трансформация β -/6-аминопуририл- N_9 - α -аланина осуществляется с образованием и накоплением в культуральной жидкости трех УФ-лучей поглощающих соединений. Авторы указывают, что схема микробиологической трансформации данных соединений, по-видимому, в начальной стадии аналогична ранее описанной в литературе схеме трансформации виллардина /7, 8/.

Настоящая статья отражает физиологические и химические данные о микробиологической трансформации трех производных DL- β -/6-аминопуририл- N_9 - α -аланина:



- I $R_1 = R_2 = H$; DL- β -1/6-аминопуририл- N_9 - α -аланин;
II $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$; DL- β -1/6-метиламинопуририл- N_9 - α -
- аланин;
III $R_1 = R_2 = CH_3$; DL- β -1/6-диметиламинопуририл- N_9 - α -
- аланин;

В работе использовали микроорганизм *Mycobacterium* sp.100 выделенный из почвы на среде с уратилом в качестве единственного источника углерода и азота /9/. Опыт проводили согласно ранее разработанной методике /II/. Бактерии выращивали на основе простей питательной среды /IQ/, где вместо пиримидинаминокислоты добавлена пуринаминокислота.

Для бумажной хроматографии использовали следующие хроматографические системы:

- I этилацетат-уксусная кислота-вода - (3:1:1)
II н-бутанол-уксусная кислота-вода - (2:1:1)
III изопропанол-25% аммиак-вода - (14:1:5)
IV изопропанол-вода - (7:3)

При помощи электрофореза определяли электрофоретическую подвижность при напряжении 400 в. При электрофорезе использовали электролиты:

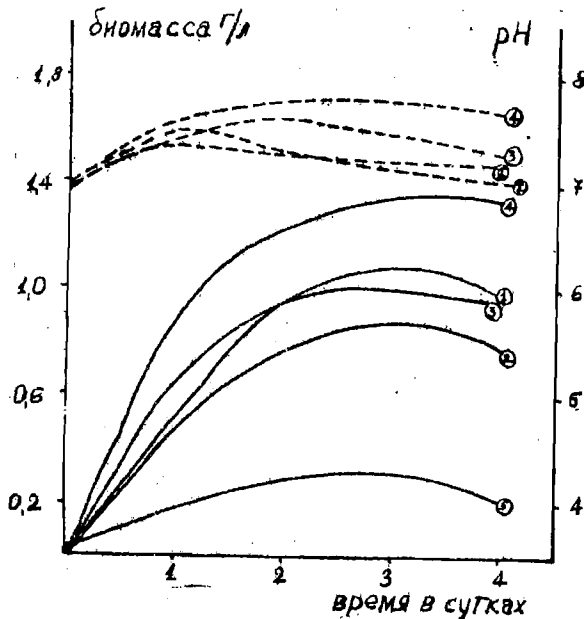
- I) pH 1,4 - 30% уксусная кислота,
II) pH 9,2 - боратный буфер 0,05 M

Результаты и обсуждения

При введении бактерий в синтетическую среду с соединениями I, II, III, служащих в качестве единственного источника азотного питания после небольшого стационарного периода наблюдается быстрое развитие микроорганизмов (рис. 1).

Рис. I

Развитие *Mycobacterium sp. 100* на средах с пуриламинокислотами и изменения pH среды.



Основа среды D +

- 1 DL-β - /6-аминопуририл-N₉/-α-аланин 0,1%
- 2 DL-β - /6-метиламинопуририл-N₉/-α-аланин 0,1%
- 3 DL-β - /6-диметиламинопуририл-N₉/-α-аланин 0,1%
- 4 (NH₄)₂SO₄ - 0,1% } контроль
- 5 без источника N }

При развитии микроорганизмов на среде с DL-β-6-аминопуририл-N₉/-α-аланином наблюдается накопление новых уф поглощающих соединений A₁, A₂, A₃, A₄; на среде с DL-β-6-ме-

тиламинопуринил-N₉- α - аланином накапливаются новые соединения A₅, A₆, A₇ и A₈, а в случае развития бактерий на среде с DL- β -/Диметиламинопуринил-N₉- α -аланином отмечено накопление соединений A₉, A₁₀, A₁₁ (схема I).

Распределение УФ абсорбирующих соединения
в начале инкубации (а) и после 72 часов
инкубации (б)

а I		б II		а III		б III	
○ A ₄		○ A ₈		○ A ₁₁			
○ A ₃		○ A ₇					
○ A ₂		○ A ₆		○ A ₁₀			
○ A ₁		○ A ₅		○ A ₉			
○	○	○	○	○		○	○

Схема I

- I DL- β -/6-аминопуринил-N₉- α -аланин 0,1 %
- II DL- β -/6-метиламинопуринил-N₉- α -аланин 0,1 %
- III DL- β -/6-диметиламинопуринил-N₉- α -аланин 0,1 %

Табл. I.
Характеристика продуктов микробиологической трансформации
производных β -/6-аминопуринил - N₉/- α -аланина

Соединения	Rf в системе				ЭП x 10 ⁻⁵ см ² в ⁻¹ сек ⁻¹		УФ -поглощение (нм)				Наблю- дние ин- гидрино- вой реак- ции
	I	II	III	IV	рН		рН 1,4		рН 9,2		
					1,4	9,2	(max)	(min)	(max)	(min)	
I β -/6-аминопуринил-N ₉ /- - α -аланин	0,15	0,32	0,21	0,12	-4,9	+1,5	259	232	261	233	+
A ₁	0,30	0,45	0,34	0,32	-3,5	+1,6	259	232	261	233	-
A ₂	0,40	0,51	0,39	0,45	-3,9	+4,5	259	232	261	235	-
A ₃ +гипоксантия	0,45	0,48	0,49	0,63	-1,9	+0,9	248	215	258	232	-
A ₄ +аденин	0,60	0,55	0,56	0,67	-7,0	-1,1	263	229	269	237	-
II β -/6-метиламинопури- нил-N ₉ /- α -аланин	0,23	0,48	0,46	-	-5,1	+1,0	263	232	266	232	+
A ₅	0,38	0,57	0,52	0,46	-3,6	+1,0	263	234	266	237	+
A ₆	0,40	0,59	0,54	0,46	-4,0	+1,1	262	233	264	235	-
A ₇	0,55	0,65	0,55	-	-5,1	+1,7	259	234	260	232	-
A ₈ + 6-метиламинопури- н/6-диметиламинопу- ририл-N ₉ /- α -аланин	0,69	0,75	0,73	0,81	-7,0	-0,5	267	237	283	244	-
III	0,26	0,50	0,62	0,39	-4,7	+2,2	268	228	273	234	+
A ₉	0,37	0,61	0,64	0,61	-3,1	+3,1	268	228	273	231	-
A ₁₀	-	-	0,65	-	-3,5	+3,2	268	228	272	242	-
A ₁₁ +6-диметиламинопури- н	0,67	0,74	0,88	0,85	-6,4	-0,7	267	228	281	245	-

Изучение хроматографической и электрофоретической подвижности, а также Уф-спектров, выделенных соединений путем прямого сравнения со "свидетелями", позволило идентифицировать соединения A_3 как гипоксантин, A_4 как аденин, A_8 как 6-метиламинопурин; A_{11} как 6-диметиламинопурин (см. табл. I).

Аденин накапливается в небольших концентрациях, так как под влиянием микобактерий это соединение путем гидролитического дезаминирования превращается в гипоксантин. Однако образующиеся из соединения II и III соответственно свободные пуриновые основания 6-метиламинопурин и 6-диметиламинопурин накапливаются в среде и дальнейшей трансформации не подвергаются.

Соединения A_1 , A_2 , A_5 , A_6 , A_7 , A_9 и A_{10} , судя по электрофоретической подвижности в щелочной среде, ведут себя аналогично кислотам, содержащих карбоксильные группы; они быстро движутся к положительно заряженному электроду. В отличие от исходных пуридинаминокислот они не дают положительной реакции с нингидрином.

Трансформация соединения II и III в начальной стадии с культурой *Mycobacterium sp. 100* осуществляется аналогично ранее изученной трансформации производных β -урацил- M_2 /-L-аланинов (виллардина и его аналогов) приводящий к образованию свободных гетероциклических оснований.

В ы в о д ы

- I. Микроорганизм *Mycobacterium sp. 100* может использовать производное β -/6-аминопуринил- N_9 /-L-аланина как единственный источник азотного питания.
- II. Трансформация DL- β -/6-аминопуринил- N_9 /-L-аланина, DL- β -/6-метиламинопуринил- N_9 /-L-аланина и DL- β -/6-диметиламинопуринил- N_9 /-L-аланина осуществляются через стадию соответствующего пуринил- N_9 -незамещенного основания: аденина, 6-метиламинопурина и 6-диметиламинопурина соответственно.

Табл. I.

Характеристика продуктов микробиологической трансформации
производных β -/6-аминопуринил - N_9 /- α -аланина

Соединения	№ в системе				ЭП $\times 10^{-5}$ $\text{см}^2 \text{в}^{-1} \text{сек}^{-1}$		УФ -поглощение(нм)				Нали- чие гидрино- вой реак- ции
	I	II	III	IV	рН		рН 1,4		рН 9,2		
					рН 1,4	рН 9,2	($\mu\text{х}$)	($\mu\text{м}$)	($\mu\text{х}$)	($\mu\text{м}$)	
I β -/6-аминопуринил- N_9 /- - α -аланин	0,15	0,32	0,21	0,12	-4,9	+1,5	259	232	261	233	+
A ₁	0,30	0,45	0,34	0,32	-3,5	+1,6	259	232	261	233	-
A ₂	0,40	0,51	0,39	0,45	-3,9	+4,5	259	232	261	235	-
A ₃ +гипоксантин	0,45	0,48	0,49	0,63	-1,9	+0,9	248	215	258	232	-
A ₄ +аденин	0,60	0,55	0,56	0,57	-7,0	-1,1	263	229	269	237	-
II β -/6-метиламинопури- нил- N_9 /- α -аланин	0,23	0,48	0,46	-	-5,1	+1,0	263	232	266	232	+
A ₅	0,38	0,57	0,52	0,46	-3,6	+1,0	263	234	266	237	+
A ₆	0,40	0,59	0,54	0,46	-4,0	+1,1	262	233	264	235	-
A ₇	0,55	0,65	0,55	-	-5,1	+1,7	259	234	260	232	-
A ₈ + 6-метиламинопури н- N_9 /- α -аланин	0,69	0,75	0,73	0,81	-7,0	-0,6	267	237	283	244	-
III β -/6-диметиламинопу- ринил- N_9 /- α -аланин	0,26	0,50	0,62	0,39	-4,7	+2,2	258	228	273	234	+
A ₉	0,37	0,61	0,64	0,61	-3,1	+3,1	258	228	273	231	-
A ₁₀	-	-	0,65	-	-3,5	+3,2	268	228	272	242	-
A ₁₁ +6-диметиламинопури	0,67	0,74	0,88	0,85	-6,4	-0,7	267	228	281	245	-

Изучение хроматографической и электрофоретической подвижности, а также УФ-спектров, выделенных соединений путем прямого сравнения со "свидетелями", позволило идентифицировать соединения A_3 как гипоксантин, A_4 как аденин, A_8 как 6-метиламинопурин; A_{11} как 6-диметиламинопурин (см. табл. I).

Аденин накапливается в небольших концентрациях, так как под влиянием микобактерий это соединение путем гидролитического дезаминирования превращается в гипоксантин. Однако образующиеся из соединений II и III соответственно свободные пуриновые основания 6-метиламинопурин и 6-диметиламинопурин накапливаются в среде и дальнейшей трансформации не подвергаются.

Соединения A_1 , A_2 , A_5 , A_6 , A_7 , A_9 и A_{10} , судя по электрофоретической подвижности в щелочной среде, ведут себя аналогично кислотам, содержащих карбоксильные группы; они быстро движутся к положительно заряженному электроду. В отличие от исходных пуринил-аминоскелетов они не дают положительной реакции с нингидрином.

Трансформация соединения II и III в начальной стадии с культурой *Mycobacterium sp. 100* осуществляется аналогично ранее изученной трансформации производных β -гуанилил- α -аланинов (виллардина и его аналогов) приводящий к образованию свободных гетероциклических оснований.

В ы в о д ы

1. Микроорганизм *Mycobacterium sp. 100* может использовать производные β -6-аминопуринил- N_9 - α -аланина как единственный источник азотного питания.
2. Трансформация DL- β -6-аминопуринил- N_9 - α -аланина, DL- β -6-метиламинопуринил- N_9 - α -аланина и DL- β -6-диметиламинопуринил- N_9 - α -аланина осуществляется через стадию соответствующего пуринил- N_9 -незамещенного основания: аденина, 6-метиламинопурина и 6-диметиламинопурина соответственно.

Л и т е р а т у р а

1. М.Ю.Лидак, Я.Я.Шлуке, Ю.П.Швачкин. Пуринил- N_9 - α -аминокислоты. ХГС, 1968, № 5, 955.
2. Я.Я.Шлуке, М.Ю.Лидак, С.А.Гиллер, Ю.П.Швачкин. Синтез /6-замещенных пуринил-9/- α -аланинов. "Современное состояние химиотерапии злокачественных опухолей". Рига, "Зинатне", 1968, I24.
3. М.Ю.Лидак, Я.Я.Шлуке, Ю.П.Швачкин, С.А.Гиллер. Синтез /6-замещенных пуринил- N_9 /- α -аланинов. Пути синтеза и изыскания противопухолевых препаратов. Рига, "Зинатне", 1970, вып. 3, I47.
4. Nollet A.I.H., C.M.Huting, U.K.Pandit. Unconventional nucleotide analogues. I. N_9 -purinyl- α -amino acids. Tetrahedron, 1969, Nr. 24, 5971.
5. Nollet A.I.H., U.K.Pandit. Unconventional nucleotide analogues. II. Synthesis of the adenylyl analogue of Willardine. Tetrahedron, 1969, Nr. 24, 5983.
6. М.Я.Витол, М.Ю.Лидак, Я.Я.Шлуке, А.И.Лешман. О химизме микробиологической трансформации /пуринил-9/- α -аланинов. Известия Акад.Наук Латв.ССР, 1970, № 7, I40.
7. Д.Э.Поммере, А.Я.Лешман, М.Я.Витол. "Новые данные о трансформации виллардина бактериями". Материалы конференции молодых ученых посвященной 100-летию со дня рождения В.И.Ленина. Рига, "Зинатне", 1970, 57.
8. М.Я.Витол, М.Ю.Лидак, Р.Цаегле, Д.Поммере, Ю.П.Швачкин. Катаболизм виллардина и некоторых его аналогов под влиянием микроорганизма рода *Pseudomonas*. Тезисы II Всесоюзного биохимического съезда. Секция - Биохимия микробов и вирусов. Ташкент, издательство "ФАН", стр. 60. 1969.

9. М.Я.Витол, Б.О.Яновска. Выделение и характеристика микроорганизмов, использующих природные основания в качестве единственного источника углеродного и азотного питания. Вопросы биологии. Рига, изд-во "Зинатне", 1969, IЗI.
10. Швачкин Ю.П., Витол М.Я., Шпрунка И.К., Арманис Л.А., Лишман А.Я. Образование 5-оксиметилпиримидинов при трансформации β -/пиримидил-5/-аланинов микроорганизмами рода *Mycobacterium*. В настоящем сборнике.
11. М.Я.Витол. Параллельные пути катаболизма урацила микробактериями. В настоящем сборнике.

ВЫДЕЛЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫХ ПРЕВРАЩАТЬ ЭКЗОГЕННЫЕ ПУРИНОВЫЕ И ПИРИМИДИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Для пуриновых и пириимидиновых соединений описан ряд химических реакций, осуществляемых ферментами микроорганизмов. В литературе описано несколько видов анаэробных микроорганизмов, способных трансформировать пуриновые и пириимидиновые соединения. Эти микроорганизмы выделены из почвы на синтетических средах методом обогащенных культур, где пуриновые и пириимидиновые соединения являются единственным источником азотного и углеродного питания.

Культура *Clostridium uracilicum* выделена на среде с урацилом в качестве источника азота и углерода /1/, а анаэробный микроорганизм *Zymobacterium oroticum* выделен на средах с оротовой кислотой в качестве источника азота и углерода. Однако, указанные микроорганизмы способны превращать только то пириимидиновое соединение, на котором они выделены.

Трансформация пуриновых соединений анаэробными микроорганизмами изучена более широко. Пуриновые соединения трансформируют *Clostridium acidurici*, *Clostridium cylindrosporum*, *Micrococcus aerogenes*, *Micrococcus lactilyticus*.

Эти микроорганизмы обладают более широким спектром действия по отношению к активному воздействию на различные пуриновые соединения, но не способны трансформировать пириимидиновые соединения /3,4,5/, исключением является *Micrococcus lactilyticus*, который медленно превращает урацил, тимин, цитозин /5/.

Как видно из приведенного материала, использование и трансформация пуриновых и пириимидиновых соединений анаэробными микроорганизмами изучены сравнительно мало, главным образом бесклеточными экстрактами или клеточными суспензиями. Неизвестно, могут ли соединения, подвергающиеся трансформации, обеспечить рост анаэробных микроорганизмов. В литературе также отсутствуют данные по использованию анаэробными

микроорганизмами в качестве основных источников питания других пуриновых и пиримидиновых соединений - нуклеотидов, нуклеозидов.

В связи с этим целью нашей работы было выделение анаэробных почвенных микроорганизмов, способных использовать и трансформировать пуриновые и пиримидиновые соединения, превращение которых имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

М е т о д и к а.

Выделение анаэробных микроорганизмов, способных превращать пуриновые и пиримидиновые соединения, проводили из садовой почвы и прудового ила. Для выделения использовали синтетическую среду следующего состава (в%): KH_2PO_4 - 0,05; Na_2HPO_4 - 0,1; $MgSO_4$ - 0,05; $FeCl_3$ - следы; глюкоза - 0,5; дрожжевой автолизат - 0,01; пуриновые и пиримидиновые соединения - 0,1; вода водопроводная, исходное pH среды 7,0 - 7,2. Непосредственно перед посевом добавляли 0,05% тиоглицерата натрия, в предварительно прогретую и быстро остуженную среду. Температура культивирования 28-30° С.

Из накопительных культур 10-12 дневного возраста проводили разделение анаэробных микроорганизмов от аэробных с помощью способа Скалона /8/. При этом материал из накопительных культур засеивали в верхнюю часть высокой пробирки, в которой находилась длинная стеклянная трубка, диаметром 2-3 мм. Сразу после засева трубку опускали до дна пробирки, не взбалтывая и не перемешивая среду. Анаэробные микроорганизмы развиваются в нижней части пробирки и в трубке, аэробные - в верхней части.

Для получения чистых культур анаэробных микроорганизмов пастеровской пипеткой брали материал из трубки и рассеивали его на чашки с агаризованной средой выше указанного состава. Чашки помещали в вакуумный эксикатор в атмосферу азота или под вакуумом. Остаток кислорода в эксикаторе поглощали щелочным раствором пирогаллола /9/. Индикатором на анаэроб-

ность служил раствор метиленового синего.

Чистые культуры поддерживали на жидкой питательной среде (в%): KH_2PO_4 - 0,05; Na_2HPO_4 - 0,1; $MgSO_4$ - 0,05; $FeCl_3$ - следы; глюкоза - 1; пептон - 1,0; дрожжевой автолизат - 0,01; пуриновое или пиримидиновое соединение - 0,1; вода водопроводная, pH среды 7,0 - 7,2. Культивирование вели в высоких пробирках в толстом слое питательной среды. Перед посевом пробирки прогревали, затем быстро остужали и добавляли триглицолят Na - 0,05%. Возможность использования пуриновых и пиримидиновых соединений проверяли на указанной синтетической среде, где источником азота служили только эти соединения. Об использовании пуриновых и пиримидиновых соединений судили по количеству накопленной биомассы в течение культивирования, оканчивающегося за 7-10 суток. Биомассу определяли нефелометрически, pH измеряли потенциометрически.

Р е з у л ь т а т ы о б с у ж д е н и я

Для выделения были использованы разные образцы садовой почвы и прудового ила. В применявшейся синтетической среде пуриновые и пиримидиновые соединения служили источником азота и углерода или только источником азота. Помимо пуриновых и пиримидиновых соединений другого источника азота не добавляли. Выделить анаэробные микроорганизмы, которые использовали бы пуриновые и пиримидиновые соединения в качестве источника азота и углерода, нам не удалось. Однако, выделено 21 вид строго анаэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов которые используют эти соединения в качестве единственного источника азота. Характеристика выделенных культур представлена в таблице I.

Выделенные строго анаэробные микроорганизмы относятся к разным видам из родов *Clostridium* и *Bacillus*. Факультативно анаэробные микроорганизмы принадлежат к роду *Achromobacter*, за исключением двух видов из рода *Pseudomonas*.

Таблица I

Характеристика выделенных культур

Соединение, на котором выделены культуры	Число выделенных культур	Р о д	Число видов	Тип культур
Урацил	5	Clostridium	2	строгие анаэробы
		Bacillus	2	- " -
		Achrombacter	1	факультативный анаэроб
Тимин	2	Clostridium	2	строгие анаэробы
Цитовин	2	Clostridium	2	- " -
Уридин	2	Clostridium	1	- " -
		Achrombacter	1	факультативный анаэроб
Оротовая к-та	2	Achrombacter	1	- " -
		Clostridium	1	строгий анаэроб
Аденин	2	Clostridium	2	- " -
Аденозин	1	Clostridium	1	- " -
ИМФ	2	Bacillus	1	- " -
		Bacterium	1	факультативный анаэроб
Виллардин	2	Pseudomonas	2	- " -

выделенных на среде с пиримидиламинокислотой виллардином.

Все выделенные культуры проверяли на способность к использованию некоторых пуриновых и пиримидиновых соединений.

Данные по использованию этих соединений представлены в таблице 2.

Таблица 2

Рост культур на средах с пуриновыми и пиримидиновыми соединениями
в качестве единственного источника азота

Культура	Выделена на	Количество биомассы в г/л при добавлении 0,1%								
		урацила	тимина	цитозина	уридина	оротовая кислота	аденина	аденозина	АМФ	
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Clostridium sp., штамм 50	урациле	0,52	0,85	0,40	0,77	0,32	0	0,45	0,48	
"	5 "	0,27	0,48	0,21	0,21	0,23	-	-	-	
Bacillus sp.,	3 "	0,54	-	-	0,27	0,27	0,40	0,52	0,60	
"	3а "	0,15	0,18	0,30	0,24	0,21	-	-	-	
Achromobacter sp.,	7 "	0,31	0,33	0,38	0,35	0,33	-	-	-	
Clostridium sp.,	503 тимине	0,36	0,40	0,37	0,31	0,14	-	-	-	
"	509 "	0,42	0,45	0,42	0,32	0,17	-	-	-	
"	402 цитозине	0,31	0,33	0,36	0,22	0,19	-	-	-	
"	406 "	0,45	0,47	0,25	0,27	0,31	-	-	-	
"	06 уридине	0,17	0,16	0,19	0,21	0,31	-	-	-	
Achromobacter sp.,	03 "	0,14	0,15	0,19	0,38	0,16	-	-	-	

Продолжение следует

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Clostridium sp.,	" 74 оротовой к-те	0,66	0,89	0,65	0,45	0,16	0,09	0,32	0,24
chromobacter sp.,	" 106 "	0,15	0,12	0,15	0,14	0,20	-	-	-
"	" 107 "	0,15	0,13	0,18	0,21	0,25	-	-	-
Clostridium sp.,	" 206 аденине	0,45	-	-	0,73	0,40	0,35	0,48	0,41
"	" 207 "	0,78	-	-	0,58	0,25	0,35	0,68	0,47
"	" 10 аденозине	0,32	-	-	0,44	0,32	0,42	0,32	0,23
Bacillus sp.,	" 17 АМЭ	0,40	-	-	0,58	0,22	0,28	0,54	0,80
Bacterium sp.,	" 19 "	-	-	-	-	-	0,11	0,69	0,75
Pseudomonas sp.,	" 609 виллардине	0,18	0,23	0,17	0,21	0,12	-	-	-
"	" 600 "	0,27	0,24	0,24	0,19	0,14	-	-	-

Из данных таблицы видно, что микроорганизмы из родов *Pseudomonas* и *Achromobacter* обладают незначительной способностью использовать проверенные пуриновые и пиримидиновые соединения, даже те, которые были использованы при выделении исследуемых микроорганизмов. Более активной группой микроорганизмов являются клостридии. Они не обладают строгой субстратной специфичностью по отношению к пуриновым и пиримидиновым соединениям, и используют почти все проверенные соединения. **Наилучшим** источником азота у многих микроорганизмов является тимин. На средах с оротовой кислотой наблюдается лишь незначительный рост. Все выделенные культуры отличаются по количеству накопленной биомассы на средах с различными пуриновыми и пиримидиновыми соединениями. Наиболее активными оказались две культуры строго анаэробных микроорганизмов, которые по определителю Берже ближе всего соответствуют *Clostridium belfantii* и *Clostridium sartagoforum* /10/.

О п и с а н и е к у л ь т у р

I. Штамм 74, *Clostridium sartagoforum*.

Микроорганизмы палочковидные (2-5 мк x 0,5-0,7 мк), располагаются парами и поодиночке. Споры овальные, терминальные, круглые, ширина их значительно превышает ширину клетки.

Строгий анаэроб, растет на средах с пептоном, гидролизатом казеина и на синтетических средах с аммонийным азотом. Нитраты не восстанавливает. Крахмал не гидролизует. Молоко пептонизирует и коагулирует. Желатину не разжижает. На картофеле не растет. Клетчатку не разлагает. Индол не образует. Выделяет сероводород. Каталазу не образует.

Использует глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, галактозу, маннит, ксилосу, декстрин. Не использует глицерин, крахмал.

Колонии на МПА средней величины с неровным краем, грязно-белые. На жидких средах растет в виде мути, в старых культурах клетки оседают.

Выделен на среде с оротовой кислотой

Кроме оротовой кислоты использует также цитозин, урацил, тимин, уридин, аденозин, аденозин-5-монофосфат.

2. Штамм 50., *Clostridium belfantii*.

Микроорганизмы палочковидные (2-5, мк x 0,5-0,7, мк), располагаются парами и поодиночке. Спорообразующие. Споры центральные, при образовании спор клетки раздуваются.

Строгий анаэроб, хорошо растет на средах с пептоном, гидролизатом казеина и на синтетических средах с аммонийным азотом.

Нитраты не восстанавливает. Крахмал гидролизует. Молоко пептонизирует и коагулирует за 48 час. Желатину не разжижает. На картофеле колонии фиолетового цвета. Клетчатку не разлагает. Индол не образует. Выделяет сероводород. Каталазу не образует.

Использует глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, галактозу, маннит, ксилозу, декстрин.

Колонии на МПА фиолетового цвета, средней величины. На жидких средах растет в виде мути, в старых культурах клетки оседают.

Выделен на среде с урацилом.

Кроме урацила использует также тимин, цитозин, уридин, оротовую кислоту, аденозин, АМФ.

В ы в о д ы

1. Из различных образцов почвы и прудового ила выделен 21 вид строго анаэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных использовать пуриновые и пиримидиновые соединения в качестве единственного источника азота.
2. Строго анаэробные микроорганизмы относятся к родам *Clostridium* и *Vacillus*, а факультативно анаэробные к разным видам из рода *Pseudomonas* и *Achromobacter*.
3. Выделенные микроорганизмы из рода *Clostridium* обладают наилучшей способностью использовать пуриновые и пиримидиновые соединения, тогда как выделенные бактерии из родов *Pseudomonas* и *Achromobacter* - лишь слабой способностью использовать изученные соединения.

4. Активные микроорганизмы из рода *Clostridium* используют не только соединения, на которых выделены, но и другие пуриновые и пиримидиновые соединения.

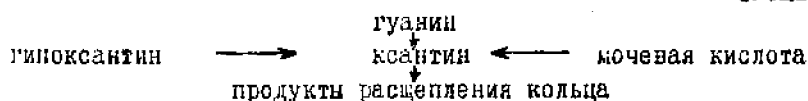
Л и т е р а т у р а

1. Campbell L.L. Reductive degradation of pyrimidines. I The isolation and characterization of a uracil fermenting bacterium, *Clostridium uracilicum* nov. spec., *J. Bacteriol.*, 1957, 73, 220.
2. Wachsman J.T., Barker H.A., 1954, Characterization of an orotic acid fermenting bacterium, *Zymobacterium oroticum*, nov. spec., nov. gen., *J. Bacteriol.*, 68, 400.404.
3. Barker H.A., Beck J.V. *Clostridium acidurici* and *Clostridium acidurici* and *Cylindrosporium*, organisms fermenting uric acid and some other purines, *J. Bacteriol.*, 1942, 43, 291.
4. Rabinowitz J.C., Barker H.A. Purine fermentation by *Cl. cylindrosporium* II Purine transformation, *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 161.
5. Whiteley H.R., Douglas H.C. The fermentation of purines by *Micrococcus lactilyticus*, *J. Bacteriol.*, 1951, 61, 605.
6. Whiteley H.R. The fermentation of purines by *Micrococcus aerogenes*, *J. Bacteriol.*, 1952, 63, 163.
7. Reed G.B., Orr J.H. Cultivation of anaerobes and oxidation-reduction potentials, *J. Bacteriol.*, 1943, 45, 309.
8. Скалон И.С. Новый способ разделения аэробных и анаэробных видов микроорганизмов, *Микробиология*, XXIX, вып. 6, 1960, 29, 1pp.
9. Pesti L. Two methods for culturing anaerobic bacteria, *Acta veterin. Acad. Scient. Hung.*, 1965, 15, 447.
10. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПУРИНА АНАЭРОБНЫМИ
МИКРООРГАНИЗМАМИ РОДА *Clostridium*

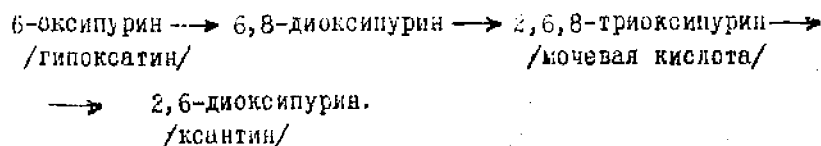
В литературе упоминается несколько видов анаэробных бактерий, которые обладают способностью расщеплять пуриновые соединения. Два вида микроорганизмов из рода *Clostridium* *Cl.acidiurici* и *Cl.cylindrosporum* быстро расщепляют ксантин, гуанин, гуанозин, 6,8 - диоксипурин, а более медленно, после периода адаптации, инозин и гипоксантин /1,2/. Нуклеозиды, инозин и гуанозин, в начале расщепляются до свободных оснований, а аденозин не подвергается трансформации. Соединением, в котором происходит разрыв пуринового кольца, является ксантин. Предполагают, что *Cl.Cylindrosporum* и *Cl.acidiurici* превращают другие пурины в ксантин по схеме 1 /2/.

Схема 1



Превращение гипоксантина /6-оксипурина/ в ксантин происходит по довольно сложному пути /1/.

Схема 2



Анаэробные бактерии *Micrococcus aerogenes* и *Micrococcus lactilyticus* быстро трансформ.руют гипоксантин, ксантин, гуанозин. Превращение аденина и гуанина происходит медленно. Пути превращения пуринов этими бактериями полностью не выяснены. Предполагают, что *Micrococcus lactilyticus* расщепляет имидазольное кольцо с образованием урацила и мочевины /3/. В процессе трансформации гипоксантина и аденина культурсы *Micrococcus aerogenes* промежуточными продуктами являются урацил и тимин, а ксантин и гуанина - урацил. Однако, эти соединения не являются основными продуктами

трансформации пуринов /4/.

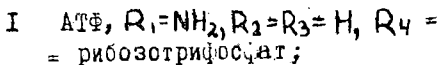
Бактерии, вызывающие трансформацию пуриновых соединений, изучены сравнительно мало. Целью настоящей работы было выяснить, могут ли анаэробные микроорганизмы *Clostridium sartagoformum* и *Clostridium belfantii*, которые хорошо превращают пириимидиновые соединения, превращать также различные пуриновые соединения.

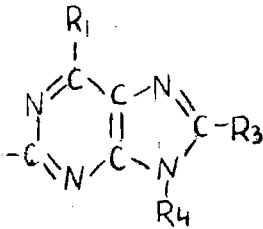
М е т о д и к а.

В работе применяли синтетическую среду следующего состава (в %): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; KH_2PO_4 - 0,05; MgSO_4 - 0,05; FeCl_3 - следы; глюкоза - 1,0; дрожжевой автолизат - 0,01; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - 0,01 /5/. При изучении возможности использования пуриновых соединений в качестве единственного источника азота, к этой среде добавляли пуриновые соединения в количестве, соответствующем содержанию азота 0,1 г/л. В опытах по трансформации добавляли дополнительный источник азота - 0,3% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, а пуриновые соединения в количестве 0,1%. Выращивание культур и трансформацию пуриновых соединений проводили в анаэробных условиях в высоких пробирках с толстым слоем питательной среды.

Определение прироста биомассы, pH, изменения химического состава культуральной среды определяли по описанной методике. При этом применялись следующие хроматографические системы растворителей: 1) Изопропанол-25% водный аммиак - вода (14:1:5); 2) изопропанол-насыщенный раствор сульфата аммония в воде (2:1); 3) этилацетат-уксусная кислота-вода (3:1:1); 4) н-бутанол-уксусная кислота-вода (2:1:1). При электрофорезе использовали электролиты: 1) pH 1-30% уксусная кислота; 2) pH 9,2 - боратный буфер.

Химические формулы и обозначения использованных пуриновых соединений





- II АдФ, R₁=NH₂, R₂=R₃=H, R₄=
= рибозодифосфат;
- III АМФ, R₁=NH₂, R₂=R₃=H, R₄=
= рибозомонофосфат;
- IV аденозин, R₁=NH₂, R₂=R₃=H,
R₄ = рибоза;
- V аденин, R₁=H₂, R₂=R₃=R₄=H
- VI инозин, R₁=CH, R₂=R₃=H,
= R₄ = рибоза;
- VII гипоксантин, R₁ = OH, R₂=R₃=
= R₄ = H

Результаты и обсуждение

В настоящей работе изучали использование и трансформацию пуриновых соединений микроорганизмами *Cl. zartagoformum* и *Cl. belfantii*, выделенными на среде с пириимидиновыми соединениями как единственном источнике азота ///. Возможность использования пуриновых соединений (основания, нуклеозидов, нуклеотидов) в качестве источника азота проверяли на среде с пуриновыми соединениями без дополнительного источника азота. В таблице I приведено максимальное количество биомассы, которое было отмечено за время развития, заканчивающегося за 7 суток.

Из таблицы видно, что только некоторые пуриновые соединения могут быть использованы в качестве единственного источника азота. Рост *Cl. zartagoformum* наблюдается на среде, содержащей аденозин, аденозин-5^l-монофосфат, аденозин-5^l-дифосфат, а также гуанин, гуанозин, гуанозия-5^l-монофосфат и мочевую кислоту. *Cl. belfantii* в качестве единственного источника азота может использовать только гуанин, гуанозин, гуанозин-5^l-монофосфат и мочевую кислоту. Однако, следует отметить, что указанные пуриновые соединения обеспечивают лишь очень слабый рост по сравнению со средой, где источником азота служит (NH₄)₂SO₄. Остальные пуриновые соединения не используются данными микроорганизмами в качестве

Таблица 1

Рост *Cl. sartagoformans* и *Cl. belfantii* на среде с пуриновыми соединениями

Источник азота	<i>Cl. sartagoformans</i>		<i>Cl. belfantii</i>	
	био-масса, г/л	pH	био-масса, г/л	pH
Аденин	0	7,10	0	7,10
Гуанин	0,25	4,30	0,25	4,30
Гипоксантин	0,19	4,30	0,22	4,40
Ксантин	0,12	5,35	0,15	4,80
Мочевая кислота	0,27	4,60	0,26	4,40
Аденозин	0,27	4,35	0,19	4,60
Гуанозин	0,25	4,20	0,24	4,40
Инозин	0	7,00	0	7,00
Адензин-5'-монофосфат	0,24	4,40	0,10	4,70
Аденозин-5'-дифосфат	0,29	4,40	0,18	4,40
Аденозин-5'-трифосфат	0,21	4,50	0,20	4,65
Гуанозин-5'-монофосфат	0,27	4,20	0,26	4,45
Гуанозин-5'-дифосфат	0,20	4,55	0,17	4,40
Гуанозин-5'-трифосфат	0,21	4,40	0,18	4,40
Инозин-5'-монофосфат	0	7,10	0,16	4,30
Инозин-5'-дифосфат	0	7,10	0,17	4,35
	0,78	4,35	0,69	4,30
Среда без источника азота (контроль)	0,20	4,20	0,19	4,30

единственного источника азота. Более того, аденин и инозин ингибирует рост обеих культур, а инозин-5'-монофосфат и инозин-5'-дифосфат - рост *Clostridium sartagoformans*

Хотя пуриновые соединения практически не используются как единственный источник азота, оказалось, что на среде с дополнительным источником азота *Cl. sartagoformans* и *Cl. belfantii* осуществляют трансформацию некоторых из этих соединений. При выращивании культур на среде с аммо-

Таблица 2

Хроматографические, электрофоретические и спектральные характеристики обнаруженных соединений и свидетелей

Пуриновые соединения	R _f в системе				ЭП × 10 ⁵ см ² , в ⁻¹ , сек ⁻¹		УФ-поглощение			
	I	2	3	4	pH 1,4	pH 9,2	pH I		pH II	
							λ _{min}	λ _{max}	λ _{min}	λ _{max}
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
АТФ	0,04	0,10	0,0	0,03	0,0	+4,32	230	257	227	259
АДФ	0,15	0,12	0,0	0,06	+0,63	+5,11	230	257	227	259
Соединение II	0,15	0,12	0,0	0,06	+0,63	+5,11	230	257	227	259
АМФ	0,17	0,22	0,06	0,20	-1,15	+5,50	230	257	227	259
Соединение III	0,17	0,22	0,06	0,20	-1,15	+5,50	230	257	227	259
Аденозин	0,60	0,69	0,58	0,65	-5,50	+1,73	230	257	227	260
Соединение IV	0,60	0,69	0,58	0,65	-5,50	+1,73	230	257	227	260
Аденин	0,62	0,72	0,66	0,66	-8,65	-0,40	229	263	237	269
Соединение V	0,62	0,72	0,66	0,66	-8,65	-0,40	229	263	237	269

Продолжение следует

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Инозин	0,60	0,60	0,33	0,43	-0,47	+2,77	223	248	224	253
Соединение УI	0,60	0,60	0,33	0,43	-0,47	+2,75	223	248	224	253
Гипоксантин	0,57	0,82	0,43	0,49	-2,0	+1,41	215	248	232	258
Соединение УII	0,57	0,82	0,43	0,49	-2,0	+1,41	215	248	232	258

* хроматографические системы растворителей и электролитов указаны в методике.

ийным азотом, содержащей аденин, в культуральной жидкости отмечается появление нового пуринового соединения /VII/. Изучение хроматографических данных, электрофоретической подвижности и УФ-спектров поглощения этого соединения позволило идентифицировать соединения VII с гипоксантином. При выращивании этих же микроорганизмов на среде с аммонийным азотом, содержащей аденозин, в культуральной жидкости появляются три новые пуриновые соединения /У/ VI, VII/. Соединение У по спектральным, хроматографическим, электрофоретическим данным соответствует аденину, соединение VI - инозину, соединение VII - гипоксантину. В случае трансформации аденозин-5'-трифосфата /I/ первым отмеченным продуктом трансформации растущими культурами является аденозин-5-дифосфат /II/, который дальше трансформируется в аденозин-5-монофосфат /III/ и аденозин /IV/.

Хроматографические, электрофоретические и спектральные данные обнаруженных соединений и свидетелей представлены в таблице 2.

Количественные данные по трансформации аденина развивающимися культурами *Cl.sartagoforum* и *Cl.belfantii* приведены в таблице 3.

Таблица 3

Пуриновые Соединения	Трансформация аденина							
	<i>Cl.sartagoforum</i>				<i>Cl.belfantii</i>			
	Количество пуриновых соединений мг/мл							
	<i>Cl.sartagoforum</i>		<i>Cl.belfantii</i>		<i>Cl.sartagoforum</i>		<i>Cl.belfantii</i>	
	0	2	5	12	0	2	5	12
	сут-сут-ки		сут-сут-ки		сут-сут-ки		сут-сут-ки	
Аденин	0,85	0,76	0,31	0,18	0,85	0,65	0,40	0,18
Гипоксантин	0	0,04	0,38	0,49	0	0,11	0,18	0,35
Сумма определенных пуриновых соединений:	0,85	0,80	0,77	0,67	0,85	0,76	0,58	0,53

* В таблице 3 и 4 приведено количество пуриновых соединений, в пересчете на пуриновое кольцо.

Уменьшение количества аденина сопровождается накоплением гипоксантина. Трансформация аденина происходит медленно и по окончании культивирования на 12 сутки в культуральной жидкости можно еще обнаружить аденин. В таблице 4 приведены данные по трансформации аденозина.

Таблица 4

Трансформация аденозина
Cl. sartagoformum *Cl. belfantii*

Пуриновые соединения	Количество пуриновых соединений мг/мл							
	<i>Cl. sartagoformum</i>				<i>Cl. belfantii</i>			
	0	2 сут-ки	5 сут-ки	12 сут-ки	0	2 сут-ки	5 сут-ки	12 сут-ки
Аденозин	0,43	0,32	0,13	0,06	0,43	0,31	0,01	0
Аденин	0	0,05	0,03	0	0	0	0,04	0
Инозин	0	0,04	0,12	0,13	0	0,05	0,14	0,14
Гипоксантин	0	0,02	0,12	0,12	0	0	0,10	0,11

Сумма определенных пуриновых соединений

0,43 0,43 0,40 0,31 0,43 0,36 0,29 0,26

Видно, что параллельно уменьшению аденозина в культуральной жидкости увеличивается количество гипоксантина и инозина. В период быстрого расщепления аденозина /2-5 сут-ки/ в культуральной жидкости появляется аденин, который быстро исчезает и накопления его не наблюдается. На среде, содержащей инозин при культивировании указанных микроорганизмов появления новых пуриновых соединений не наблюдается. Количество гипоксантина в среде, где последний является единственным источником азота или на среде с дополнительным источником азота в течение культивирования почти не изменяется. Данные приведены в таблице 5.

Таблица 5

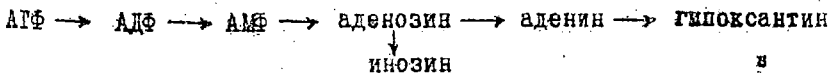
Рост *Cl. sartagoformum* и *Cl. belfantii* на среде с гипоксантином и дополнительным источником азота

Время в сут-ках	<i>Cl. sartagoformum</i>			<i>Cl. belfantii</i>		
	биомасса, г/л	pH	гипоксантин, мг/мл	биомасса, г/л	pH	гипоксантин, мг/мл
0	0,025	7,0	1,10	0,025	7,0	1,10
2	0,327	4,40	1,10	0,40	4,50	1,01
5	0,98	4,25	1,06	0,85	4,20	1,00
12	0,96	4,40	1,00	0,79	4,30	0,98

Таким образом, можно считать, что под влиянием развивающихся культур *Cl. sartagoformum* и *Cl. belfantii* из аденозина образуется аденин, который дальше дезаминируется в гипоксантин. Параллельно с деривозидацией аденозина происходит его дезаминирование с образованием инозина, который накапливается в культуральной жидкости наряду с гипоксантином. Несмотря на то, что на среде, содержащей гипоксантин, появление новых пуриновых соединений не наблюдается, сумма определяемых пуриновых соединений в случае трансформации аденина и аденозина в течение культивирования уменьшается (таблица 3 и 4). Можно предполагать, что происходит расщепление пуринового кольца, поскольку общее количество пуриновых соединений в среде в течение культивирования указанных микроорганизмов явно падает.

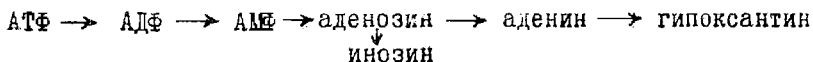
Количественные и качественные исследования трансформации производных аденина развивающимися культурами *Cl. sartagoformum* и *Cl. belfantii* свидетельствуют о том, что трансформация производных аденина идет по схеме 3.

Схема 3



В ы в о д ы

1. Микроорганизмы *Cl.sartagoformum* и *Cl.belfantii* не могут использовать или используют очень слабо пуриновые соединения как единственный источник азота.
2. При наличии другого источника азота развивающиеся культуры способны трансформировать некоторые из пуриновых соединений.
3. Трансформация производных аденина осуществляется по схеме:



Л и т е р а т у р а

1. Barker H.A., Beck J.V. *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporum*, organisms fermenting uric acid and some other purines, *J. Bacteriol.*, 1942, Nr. 2913, 304.
2. Rabinowitz J.C., Barker H.A. Purine fermentation by *Cl. cylindrosporum*. II Purine transformation. *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 161.
3. Whiteley H.R., Douglas H.C. The fermentation of purines by *Micrococcus lactilicus*, *J. Bacteriol.*, 1951, 61, 605.
4. Whiteley H.R. The fermentation of purines by *Micrococcus aerogenes*, *J. Bacteriol.*, 1952, 63, 163.
5. Дунцис М.Э. условия культивирования анаэробных микроорганизмов, выделенных на средах с пиримидиновыми соединениями. Биологические науки (в печати).

Блумберг Е.М., 1950, Прибор для хроматографирования и химического анализа в ультрафиолетовых лучах, ДАН СССР, 1950, 72, 885.

Дунцис М.Э. Витол М.Я., 1970, Выделение анаэробных микроорганизмов, способных трансформировать пуриновые и пиримидиновые соединения. (В настоящем сборнике).

Витол М.Я. Параллельные пути катаболизма урацила микробактериями (в настоящем сборнике).

Л.В.Медведева, М.Я.Витол, В.Х.Вольский

ВОЗМОЖНОСТЬ РАЗДЕЛЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СРЕДАХ С ПУРИНОВЫМИ И ПИРИМИДИНОВЫМИ НУКЛЕОЗИДАМИ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОГО ИСТОЧНИКА ПИТАНИЯ

Различные группы бактерий вызывают самые разнообразные биохимические процессы в почве, оказывающие непосредственное влияние на продуктивность развития сельскохозяйственных растений.

Среди разнообразных процессов, развивающихся в почве и обуславливающих ее плодородие, существенное значение имеет процесс минерализации нуклеиновых кислот (НК), а также низкомолекулярных пуриновых и пиримидиновых соединений, как структурных компонентов НК. Источниками НК почвы служат растения, микроорганизмы, а также, вносимые в почву органические и гуминовые удобрения, из которых в процессе разложения освобождаются и поступают в почву рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые кислоты и продукты их расщепления (I).

В деградации НК почв большая роль принадлежит микроорганизмам, которые используют НК и продукты гидролиза НК для своей жизнедеятельности. Однако, в настоящее время слабо изучена группа почвенных микроорганизмов, использующих пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды в качестве основных источников питания. Несомненно, что эти микроорганизмы активно участвуют в круговороте углерода, азота и фосфора в природе.

Целью настоящей работы явилось выяснение некоторых закономерностей в делении из почв микроорганизмов, способных использовать продукты гидролиза НК - пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды в качестве основного источника питания.

М е т о д и к а

Первичным посевным материалом служили различные образцы почв, взятые в садах и парках города Риги и ее окрестностей, а также с территории Рижского Ботанического сада.

Пробы брались весной, в начале лета и осенью.

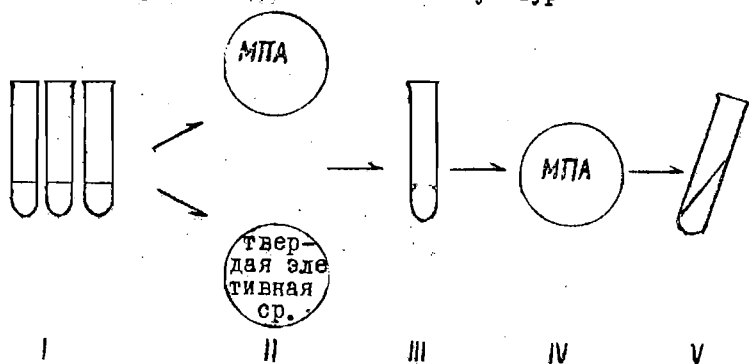
Выделение микроорганизмов проводилось методом накопительных культур на основе синтетической среды А следующего состава (в процентах): K_2HPO_4 - 0,27; KH_2PO_4 - 0,13; $MgSO_4$ - 0,01; $NaCl$ - 0,1; $FeCl_3$ - 0,001; смесь микроэлементов (Mn^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Co^{++} , MoO_4 , VO_3) дистиллированная вода. pH среды - 7,0-7,2 - доводилось при помощи NaOH. К основе среды А добавляли нуклеозидный компонент в концентрации 0,2%. В некоторых случаях, рассмотренных ниже, выделение микроорганизмов проводилось при добавлении к основе среды А дополнительного источника углерода в качестве которого использовались лимонная кислота (0,1%), глицерин (0,4%), взятые в совокупности. В качестве плотных питательных сред использовались мясо-пептонный агар (МПА) или среда А с добавлением 2% агара, обозначаемая далее как "твердая элективная среда".

Среды, содержащие в качестве нуклеозидного компонента уридин, тимидин, аденозин - стерилизовались автоклавированием при 0,5 атм 20 минут. Стерилизация сред, содержащих цитидин, дезоксицитидин - пропусканием через мембранный бактериальный фильтр № 3.

Метод накопительных культур.

Из взятых образцов почв готовилась водная суспензия из расчета 1/3 объема почвы на 2/3 объема воды. 1-2 капли суспензии добавлялись в пробирки со средой. Объем среды в пробирке составлял 2 мл. Пробирки инкубировались в термостате при температуре 28°C. Развитие микроорганизмов приводило к помутнению среды, после чего проводилось 2-3 последовательных пересева на жидкие среды того же состава. Из последнего пересева проводили посев на чашки Петри с МПА или твердой элективной средой. С чашек Петри отдельные колонии засеивались на жидкую среду первоначального состава. Чистота культур проверялась по колониям после высева на чашки Петри с МПА, а также микроскопически. Рост накопительных культур в пробирках со средой определялся визуально и оценивался по 5-бальной системе.

Схема выделения чистых культур



- I - жидкая электролитивная среда,
- II - чашки Петри с полученными отдельными колониями,
- III - жидкая электролитивная среда (засев из одной колонии, проверка специфичности культуры);
- IV - проверка чистоты культуры;
- V - сохранение бактерий.

Результаты

Из пяти образцов почв, служащих в качестве первичного посевного материала нами получены накопительные и чистые культуры бактерий, использующих пуриновые и пиридиновые нуклеозиды и дезоксирибонуклеозиды в качестве основного источника питания. (табл. I). При выделении микроорганизмов обнаружены некоторые закономерности, зависящие от конкретной химической структуры гетероциклического соединения, входящего в питательную среду, и от наличия или отсутствия в среде дополнительного компонента углеродного питания. Указанные факторы влияют на характер развития накопительных культур и на их видовой состав.

Все использованные среды с пуриновыми и пиридиновыми нуклеозидами позволяют выделить активные культуры, использующие конкретный нуклеозид в качестве единственного источника углеродного и азотного питания. Однако, как следовало ожидать, добавление к электролитивной среде дополнитель-

Средний состав по группам.

Таблица I

Развитие накопительных культур и их состав по группам, при выделении микроорганизмов на средах с различными нуклеозидами

(через 62 часов культивирования)

Среда	№ пробы почвы	Развитие бактерий при последовательных посевах накопительной культуры*			Накопительные культуры (штрихи на МПА)	
		I	II	III	группа**	%
Среда А +	1					
	2					
	3	3	3	3	I	25%
	4	3	4	4		
5	3	3	5			
5	3	3	4			
+ уридин	1					
	2					
	3	4	4	4	I	10%
	4	3	3	4		
5	3	3	4			
5	3	3	4			
+ Цитидин	1					
	2					
	3	4	4	4	I	10%
	4	3	3	4		
5	3	3	4			
5	3	3	4			
+ аденозин	1					
	2					
	3	3	4	4	I	0%
	4	4	4	4		
5	3	4	4			
5	3	4	4			
+ гуанозин	1					
	2					
	3	4	4	4	I	0%
	4	4	4	4		
5	3	3	3			
5	3	3	5			

продолжение таблицы см. на стр. 60

* развитие определялось визуально по 5 бальной системе: (5 - очень высокое накопление биомассы);

** Описание каждой группы в тексте.

*** процентуальное соотношение отличающихся колоний в накопительной культуре, взятой в совокупности по пять пробам

I	2	3	4	5	6	7
+ ТИМИДИН	1	4	4	4	1 } 2 } 3 }	- 20% 80%
	2	3	3	3		
	4	2	2	2		
	5	-	-	-		
+ ДЕЗОКСИЦИТИДИН	1	5	3	3	1 } 2 } 3 }	- 15% 85%
	2	4	4	4		
	3	"	"	"		
	4	-	-	-		
	5	-	-	-		
+ УРИДИН + ИТС.С	1	5	5	5	1 } 2 } 3 }	- - 100%
	2	5	5	5		
	3	5	5	5		
	4	5	5	5		
	5	5	5	5		
+ АДЕНОЗИН + ИТС.С	1	4	5	5	1 } 2 } 3 }	- - 100%
	2	5	5	5		
	3	5	5	5		
	4	5	5	5		
	5	5	5	5		
+ ГУАНОЗИН + ИТС.С	1	5	5	5	1 } 2 } 3 }	- - 100%
	2	5	5	5		
	3	5	5	5		
	4	5	5	5		
	5	5	5	5		

ного источника углеродного питания ускоряет развитие бактерий в накопительных культурах и позволяло выделить культуры из всех образцов обследованных почв.

Из накопительных культур, при помощи описанной методики выделены чистые культуры, различающиеся по характеру колоний на МПА.

Группа. I. Мелкие желтые или ярко желтые, блестящие, круглые выпуклые колонии с гладкими краями.

Группа 2. Колонии на МПА очень мелкие или средних размеров, круглые, выпуклые, слизистые с гладкой, блестящей поверхностью, белого, розового или кремового цвета. Характерно, что при продолжительном культивировании в лабораторных условиях наблюдается расщепление культур. Новые колонии в

этом случае выглядят бугристыми, пастообразными, с рисунчатой поверхностью и зубчатыми краями.

Группа 3. Колонии средних и крупных размеров, слизистые. Края волнистые и гладкие. Цвет сероватый, зеленоватый, желтоватый, полупрозрачные. Иногда выделяют зеленый флуорисцирующий пигмент.

Из трех групп были отобраны по шесть штаммов, с которыми проводились дальнейшие исследования. При изучении физиологических и морфологических свойств по определителю Берджи отобранные бактерии из I группы наиболее близки к роду *Flavobacterium* из 2 группы - к *Mycobacterium* из 3 группы - к *Pseudomonas*. На средах, содержащих пириимидиновые рибонуклеозиды в качестве единственного источника органического питания выделяются микроорганизмы всех 3-х групп. Однако наиболее представлены микроорганизмы из группы 3. На аналогичных средах с пуриновыми нуклеозидами не наблюдаются накопление и выделение микроорганизмов из групп I и 2. Добавление к элективным средам дополнительных органических источников углерода способствует накоплению и выделению только микроорганизмов из группы 3, независимо, гетероциклическим компонентом являлся пуриновый или пириимидиновый нуклеозид.

Проверенные микроорганизмы из рода *Flavobacterium* и *Mycobacterium* не могли использовать пуриновые и пириимидиновые нуклеозиды в качестве единственного источника углеродного и азотного питания. Эти микроорганизмы выделяются в качестве сопроводительных культур специфических микроорганизмов рода *Pseudomonas*, которые хорошо развиваются на средах, содержащих конкретный нуклеозид в качестве единственного источника углерода и азота. Свойства микроорганизмов рода *Mycobacterium* нами описаны /2/. Они, используя пириимидиновые основания в качестве основного субстрата, свое воздействие на пириимидиновые нуклеозиды в основном проявляют только после расщепления нуклеозидной связи, что по видимому осуществляют микроорганизмы рода *Pseudomonas*.

Таким образом выяснено, что среды, как с пуриновыми,

так и с пиримидиновыми нуклеозидами, способствует накоплению микроорганизмов в случаях, когда любой из нуклеозидов является единственным источником углеродного и азотного питания. По ходу изучения чистых культур, полученных на средах с пуриновыми и пиримидиновыми рибо- и дезоксирибонуклеозидами ясно проявляются некоторые закономерности. Во всех случаях, независимо от конкретной химической структуры нуклеозида в накопительных культурах доминирующими являются микроорганизмы рода *Pseudomonas*.

В ы в о д ы

1. Из различных образцов почв на средах, содержащих пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды, в качестве единственного источника углеродного и азотного питания выделено 55 штаммов микроорганизмов, принадлежащих к родам *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*.
2. На средах с пуриновыми и пиримидиновыми нуклеозидами с дополнительным источником углеродного питания происходит преимущественное накопление микроорганизмов рода *Pseudomonas*.

Л и т е р а т у р а

1. М.Н.Бурангулова. Нуклеиновые кислоты почв. Сб. Биология нуклеинового обмена у растений. Изд. "Наука", М., 1964, 52.
- 2: М.Я.Витол. Некоторые физиологические свойства микобактерий, использующих природные пиримидиновые основания в качестве единственного источника органического питания. В настоящем сборнике.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ
И НУКЛЕОЗИДОВ КАК ЕДИНСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА АЗОТА ДРОЖЕЙ
РОДОВ *Candida* и *Torulopsis*

Из органических соединений источниками азота для дрожжей могут служить не только аминокислоты, но и пуриновые и пириимидиновые соединения. Ценность различных азотистых оснований и их нуклеозидов как источников азота для различных дрожжей характеризуется большим разнообразием /1/. Более подробно спектр использования пуринов и пириимидинов, их нуклеозидов и нуклеотидов и продуктов их возможного превращения исследован у видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis* /2,3/. Источники азота, в том числе и пурины и пириимидины как показатели систематического положения дрожжей проверены у представителей родов *Pichia*, *Debaryomyces* и *Saccharomyces* /4/.

Более обширные исследования различных видов дрожжей по их способностям использовать пуриновые и пириимидиновые основания и их возможных продуктов катаболизма провели канадские исследователи La Rue и Spencer /5/. В дальнейшем наши данные будут сопоставляться с результатами этих авторов.

В наших опытах проверялась способность дрожжей *Candida* и *Torulopsis* использовать в качестве единственного источника азота пурины: аденин, гуанин, аденозин, гуанозин и пириимидины: цитозин, тимин, урацил, уридин, оротовую кислоту.

Объекты и методика исследования

Было исследовано 10 культур из рода *Candida* и 7 - *Torulopsis*.

Для культивирования дрожжей использовалась среда Ридер, в которой был заменен сульфат аммония на соответствующее пуриновое или пириимидиновое соединения в количестве 0,1%.

Для обеспечения роста к среде добавлялась смесь микро-

Список исследованных культур

Название вида	Откуда получена культура
<i>Candida clausenii</i> Lodd et. Kr.	МГУ
<i>Candida crusei</i> (A. Cast) Berkh.	Институт микробиол. АН ЛССР
<i>Candida mycoderma</i> (Reess) Lodd et. Kr.	- " -
<i>Candida pseudotropicalis</i> (Cast) Basgal	- " -
<i>Candida quilliermondii</i> (Cast) Long et Guerra	ИНМИ ВКМ-У-916
<i>Candida rugosa</i> 625 (Ashf.) Cif. et Ashf.	Институт микробиол. АН ЛССР
<i>Candida</i> sp. Красноярск-9	Ин-т химии древесины АН ЛССР
<i>Candida tropicalis</i> СК-4 (Cast.) Berk Berkh.	МкрНИИСП
<i>Candida utilis</i> Lodd. et Kr.	Институт микробиол. АН ЛССР
<i>Candida zeylanoides</i> (Cast) Long et Guerra	" " -
<i>Torulopsis glabrata</i> Lodd. et de Vries	- " -
<i>Torulopsis holmii</i> Lodder	- " -
<i>Torulopsis lactis - condensii</i> Hammer	- " -
<i>Torulopsis lanata</i>	- " -
<i>Torulopsis inconspicua</i> Lodd. et Kr.	- " -
<i>Torulopsis liquefaciens</i> Saito et Ota	ИНМИ ВКМ-У-744
<i>Torulopsis stellata</i> (Kr. et Kr.) Lodder	Институт микробиол. АН ЛССР

элементов /6/ и смесь из шести витаминов группы В (биотин, инозит, пантотеновая кислота, тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин) /7/.

Начальная величина рН среды - 4,5 - 5,5.

Засевным материалом служила 48-часовая культура дрожжей выращенная на косом суслоагаре. Питательную среду заражали микропосевом по способу Е.Н.Одичовой /7/. В каждом опыте ставили два контроля: 1) среда Ридер без источника азота. Этим удостоверились, что остальные составные части среды не содержат примесей азота, которые могли бы обеспечить рост испытуемой культуры и что данные культуры не способны фиксировать атмосферный азот. Надо отметить, что ни одна из культур в этой среде роста не давала; 2) среда Ридер с аммонийным источником азота. Результаты сравнивались с этим контролем.

В остальных пробирках опыта добавлялся в качестве источника азота тот или иной пурин или пиридин.

Дрожжи культивировались при + 27°C в стационарных условиях в наклонном положении в пробирках (18x195 мм) с объемом питательной среды 1 мл. Длительность опыта 96 часов. О способности дрожжей размножаться в данной среде судили по оптической плотности культуры, определяя на фотоэлектрокалориметре ФЭК-56, используя синий фильтр № 4. Перед определением плотности культура разбавлялась крановой водой 10 раз.

Р е з у л ь т а т ы и и х о б с у ж д е н и е

На таблице 2 показан относительный рост дрожжей в средах с различными источниками азота: за 100% принимается рост в среде с аммонийным источником азота.

Как видно из полученных данных, пуриновые и пиридиновые соединения как единственный источник азота исследованными дрожжами родов *Candida* и *Torulopsis* используются по-разному и виды одного рода по этому признаку могут сильно отличаться друг от друга. К такому же выводу пришли и La Rue и Spender /5/, проверяя способность 123 разных видов дрожжей, в том числе 10 видов рода *Torulopsis* и 15 - рода *Candida*.

Большинство исследованных дрожжей хорошо используют,

как единственный источник азота, соединения со свободной NH_2 группой - т.е. все исследованные пурины и пиримидин-цитозин. Это свидетельствует о широком распространении соответствующих дезаминаз у разных видов дрожжей, констатированных у отдельных видов /1,2,8,9/.

Аденин не используют только три из исследованных видов - *Candida rugosa*, *Torulopsis lanata* и *T.stellata*. Очевидно, эти дрожжи имеют весьма ограниченный набор ферментов по отношению к исследованным пуринам и пиримидинам, они используют только гуанин, гуанозин и цитозин. Интересно, что из 15 видов *Candida*, проверенных канадскими исследователями, аденин не использовали 2 - *C.brumptii* и *C.curvata*, *C.brumptii* не использовал ни одного основания, *C.curvata* использовал только цитозин. Из 10 видов *Torulopsis* тоже два вида не использовали аденин - неактивный *T.groeningsii*, не использовавший ни одного основания, и *T.colliculosa*, использовавший гуанин и цитозин.

Остальными дрожжами аденин используется хорошо и частью дрожжей в среде с аденином растет лучше, чем в контрольной среде. Дрожжи, которые не усваивают азот аденина, не могут использовать также его нуклеозид как источник азота. *Candida clausenii*, *C.pseudotropicalis* и *T.holmii* используют только аденин, а не аденозин.

Гуанин проверенными дрожжами тоже используется хорошо за исключением только одного вида - *C.clausenii*.

Гуанозин не способны использовать два вида - уже упомянутый *C.clausenii* и *T.holmii*. По La Rue и Spencer /5/, гуанин не использовался тремя дрожжами не способными использовать и аденин - *C.brumptii*, *C.curvata*, *T.groeningsii*.

Дрожжей, использующих нуклеозид и не использующих соответствующего основания, среди данной группы дрожжей не найдено. Интенсивность роста дрожжей в среде с аденозином существенно не отличается от вариантов с аденином в случае использования этих соединений. Гуанозин дрожжами

Таблица 2

Использование дрожжами родов *Candida* и *Torulopsis* пуриновых и пиримидиновых оснований и их нуклеозидов в качестве единственного источника азота

Дрожжи	Относительный рост дрожжей при различных источниках азота в %									
	(NH ₄) ₂ SO ₄	Аденин	Аденозин	Гуанин	Гуанозин	Тимин	Цитозин	Урацил	Уридин	Среднее в %
<i>C. clausenii</i>	100	104	0	0	0	0	46	0	0	0
<i>C. crusei</i>	100	100	81	93	122	0	42	0	0	0
<i>C. mycoderma</i>	100	149	90	83	90	0	61	0	0	0
<i>C. pseudotropi- calis</i>	100	17	0	73	42	0	107	100	81	27
<i>C. guilliermondii</i>	100	110	110	97	124	0	100	0	0	0
<i>C. rugosa</i> 625	100	0	0	92	119	0	43	0	0	0
<i>C. sp. Красно- РСК-9</i>	100	92	79	100	100	0	100	92	95	59
<i>C. tropicalis</i> СК-4	100	113	103	136	12	0	107	28	28	0
<i>C. utilis</i>	100	96	96	92	79	0	104	88	0	26
<i>C. zeylanoides</i>	100	245	164	154	147	0	44	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	100	119	113	72	86	0	97	119	0	35
<i>C. holmii</i>	100	157	0	37	0	0	136	0	0	0
<i>C. inconspicua</i>	100	141	115	146	115	0	79	41	0	22
<i>C. lactis-condensis</i>	100	80	79	79	79	0	82	76	0	22
<i>C. lanata</i>	100	0	0	195	250	0	51	0	0	0
<i>C. liquefaciens</i>	100	74	84	78	95	0	50	0	0	0
<i>C. stellata</i>	100	0	0	119	31	0	142	0	0	0

используется лучше, чем гуанин.

Пиримидин со свободной NH_2 группой - цитозин используется всеми исследованными дрожжами, но в большинстве случаев менее интенсивно, чем пурины. Среди видов дрожжей, проверенных La Rue и Spencer цитозин не использовался 3 видами *Candida* и 3 - *Torulopsis*.

Использовать урацил и его производные как единственный источник азота могут только те дрожжи, которые способны тем или иным путем расщеплять пиримидиновое кольцо. Оказавшаяся, что эта способность у исследованных дрожжей довольно ограничена. Из 17 дрожжей рода *Candida* и *Torulopsis* только 7 осуществляют расщепление урацила. Это согласуется с литературными данными /5/, где из 25 видов урацил используют 6. Способность использовать уридин у данной группы дрожжей еще слабее. Это соединение используется только *Candida pseudotropicalis*, С.сп. Красноярск-9, *C.tropicalis* СК-4. Очевидно, нуклеозидаза уридина, найденная Картером (1951) у перкарских дрожжей (цит. по I) имеется не у всех родов и видов дрожжей.

В среде с оротовой кислотой как единственным источником азота слабый рост давали те дрожжи, которые использовали урацил, за исключением *Candida tropicalis* СК-4. Дрожжей, использующих оротовую кислоту и не использующих урацил, не было. Слабый рост в среде с оротовой кислотой давал и вид *Candida utilis*, хотя по литературным данным /3/ этот вид оротовую кислоту использовать не способен.

Тимин как единственный источник азота не использовался ни одним видом исследованных дрожжей родов *Candida* и *Torulopsis*. По данным канадских исследователей в среде с тиминном хорошим рост давали дрожжи *Candida bogoriensis*. Это свидетельствует о том, что способность дрожжей родов *Candida* и *Torulopsis* использовать тимин ограничена.

Интересно отметить, что некоторые из проверенных дрожжей обладают полным (*Candida tropicalis* СК-4, С.сп. Красноярск-9) или почти полным (*Candida pseudotropicalis*, *C.utilis*, *Torulopsis glabrata*, *T.inconspicua*, *T.lactis-condensi*).

е ором ферментов для получения азота из исследованных
е инowych и пиримидиновых соединений. У других, наобо-
е , соответствующих ферментов мало - например,
е) *Candida clausenii*, *C.rugosa*, *Torulopsis holmii*,
lanata, *T.stellata*.

В ы в о д и

- 1 Способность использовать в качестве единственного источ-
ника азота пуриновые и пиримидиновые основания и их
нуклеозиды у видов родов *Candida* и *Torulopsis* силь-
но варьирует.
2. Хорошим источником азота являются те пуриновые и пири-
мидиновые основания и их нуклеозиды, которые имеют сво-
бодную NH_2 группу. Эти соединения с некоторыми исклю-
чениями используются всеми исследованными дрожжами.
- 3 Пуриновые и пиримидиновые соединения, которые имеют азот
только в пиримидиновом кольце, исследованными дрожжами
родов *Candida* и *Torulopsis* использовались хуже.
Урацил использовался 7 видами, уридин - 3, оротовая
кислота 6 видами проверенных дрожжей. Тимин исследован-
ными дрожжами не использовался.

Л и т е р а т у р а

1. G.Harris. Nitrogen metabolism "The Chemistry and Biology
of yeasts" edd. by A.H.Cook, New York, 1958, 439.
2. F. F. Di Carlo, A.S.Schultz, D.K.McManus. The assimilation
of nucleic acid derivatives and related compounds
by yeasts. *J.Biol.Chem.*, 1951, 89, 151.
3. F. F. Di Carlo, A.S.Schultz, A.M.Kent. On the mechanism of
pyrimidine metabolism by yeasts. *J.Biol.Chem.*,
1952, 199, 333.

4. F. Abadie. Исследования потребления некоторых органических соединений азота при изучении систематики
рр. *Pichia*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*. цит. по Реф. журнал, 1968, № II, Б 412.
5. T. A. La Rue, I. F. T. Spencer. The utilization of purines and pyrimidines by yeasts. *Canad. J. Microbiol.* 1968, 14, 79.
6. R. J. Williams, D. H. Saunders. The affects of inositol, crystalline vitamin B₁ and pantothenic acid on the growth of different strains of yeast. *Biochem J.*, 1934, 28, 1887.
7. Е. Н. Одинцова. Микробиологические методы определения витаминов. Изд. АН СССР. М., 1959
8. Kream J., Chargaff E. On the cytosine deaminase of yeasts. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 5157.
9. M. Parvin. Purification and properties of adenine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissert. Abstracts*, 1966, B, 27, 1785.

С.Р.Вилкс, М.Я.Витол, И.М.Пурлаура

РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТАХ ТИМИН ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ И ИХ МЕТАБОЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Известно, что пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот могут служить хорошим источником азота, обеспечивающим нормальное развитие дрожжей /1,2,3,4/. Этими авторами также отмечено, что способность использовать разные основания различными видами дрожжей, варьирует. Так, проверяя способность 59 музейных культур дрожжей использовать пуриновые и пиримидиновые соединения, констатировано, что большинство дрожжей используют аденин (95%), гуанин (87%) и цитозин (93%), 58% способны использовать урацил, но тимин не использовала ни одна из проверенных культур /4/. Эти наши данные согласуются с данными канадских исследователей La Rue, Spencer (1968) /3/, которые при проверке 123 видов дрожжей, получили сходные результаты. Только 13 видов /11% / оказались способными использовать тимин как источник азота. Это свидетельствует о том, что только ограниченное число дрожжей способны расщеплять кольцо тимина и использовать его как единственный источник азотного питания. Но несмотря на это, мы предполагаем, что в природе довольно часто встречаются дрожжи, способные использовать тимин.

Настоящая работа посвящена изучению этих дрожжей и установлению катаболического пути расщепления тимина. В литературе нам не удалось найти сведений о том, каким путем происходит расщепление тимина в дрожжах, хотя исследованию катаболизма остальных природных пиримидиновых соединений посвящены работы нескольких авторов /2,5,6/.

М е т о д ы

Для выделения дрожжей применялся метод накопительных культур. Использовалась элективная среда следующего состава: KH_2PO_4 - 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01%; $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,02%; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,01%; сахара - 10%, дрожжевой

автолизат - 0,01%, тимин - 0,1%. рН среды 5,0.

Для освобождения от посторонней микрофлоры и выделения чистой культуры дрожжей, способной использовать тимин как единственный источник азота, пересев накопительной культуры велся по следующей схеме:

пробирка с селективной средой

↓
там же

↓
там же

↓
чашка Петри с сусло агаром

↓
пробирка с селективной средой

↓
чашка Петри с сусло агаром

↓
пробирка с сусло агаром

Для определения полученных чистых культур использовалась методика, описанная в определителе дрожжей Lodder, Kreger van Rij /7/. Для исследования динамики роста дрожжей использовалась среда Ридер /8/ и среда Ридер, где неорганический источник азота замещен на тимин в концентрации 0,1%. Дрожжи культивировались при 27° в условиях принудительной аэрации на качалках при 100 об/мин. (колбы емкостью 300 мл содержащие по 50 мл среды). Через каждые 12 часов определялся прирост биомассы нефелометрически, изменения рН среды потенциометром и химические изменения пиридино-вых соединений в среде с тимином по ранее описанной методике /9/.

Р е з у л ь т а т ы

Методом накопительных культур из разных природных субстратов - почвы, водоемов и эпифитной микрофлоры растений - выделено 12 штаммов дрожжей, способных использовать тимин как единственный источник азота (табл. I).

Все выделенные дрожжи пигментированы в красный цвет, оттенок которой у некоторых штаммов отличается. На сусло агаре все штаммы образуют красные, слизистые колонии с

Список выделенных штаммов дрожжей

№	Обозначение штаммов	С у б с т р а т	
1.	T ₇	ПЛОДЫ	<i>Hippophae rhamnoides</i>
2.	T ₈	"	<i>Cudonia japonica</i>
3.	T ₉	"	<i>Sorbus melanocarpa</i>
4.	T ₁₀	"	<i>Malus domestica</i>
5.	T ₆	Цветы	<i>Srepis paludosa</i>
6.	T _I	Почва окультуренная	
7.	T ₄	"	"
8.	T _{II}	"	"
9.	T ₅	"	песчаная
10.	T ₃	"	огородная
11.	T ₂	Гравень, мелкий	
12.	T ₁₂	Вода Кишозера	

ровными краями, в жидкой среде растет на поверхности, образуя тонкую пленку и осадок. Клетки овальные или округлые, размеры у разных штаммов варьирует в пределах (3,6-8,3) x (3,2-4,8) мк. Размножаются почкованием, спор не образуют. Развивается аэробно, глюкозу не сбраживают. Ассимилируют глюкозу, мальтозу, сахарозу, галактозу. По способности использовать лактозу разные штаммы отличаются: T_I, T₅, T₆, T₇, T₉, T₁₀ - не ассимилируют лактозу, T₄, T_{II}, T₁₂ - ассимилируют слабо, но T₂, T₃, T₈ на среде с лактозой растут хорошо.

Но упомянутые отличия штаммов не имеют видового значения и по определителю Lodder, Kreger van Rij все относятся к виду *Rhodotorulas glutinis* (Fres.) Harrison. У всех штаммов так же обнаружено выделение слизистых капсул, наличие которых является характерной чертой *Rhodotorula glutinis* (Fres) Harrison. (10)

Полученные данные, во-первых, свидетельствуют о том, что дрожжи *Rhodotorula glutinis* широко распространены в природе в разных субстратах, что согласуется с лите-

ратурными данными. Дрожжи *Rh. glutinis* найдены в разных почвах и в фекалиях животных /II/, на плодах и в сметане и простакваше /I2/, в водоемах /I3/, на коже людей /I4/.

Во-вторых, все выделенные дрожжи, использующие тимин принадлежат к одному виду - *Rh. glutinis*. Это свидетельствует о том, что способность активно использовать тимин, присуща только ограниченному числу видов дрожжей и является характерным свойством штаммов дрожжей *Rh. glutinis*, встречающихся в природных субстратах.

Интенсивность роста на среде с тимином как единственным источником азота у разных штаммов разная и все выделенные штаммы можно разделить на две группы:

- I - штаммы, интенсивно развивающиеся на среде с тимином, у которых \log период в выше указанных условиях начинается через 36 часов - $T_1, T_2, T_7, T_4, T_{12}$.
- II - штаммы, развивающиеся менее интенсивно - \log период начинается через 60 часов - $T_3, T_5, T_6, T_8, T_9, T_{10}, T_{11}$.

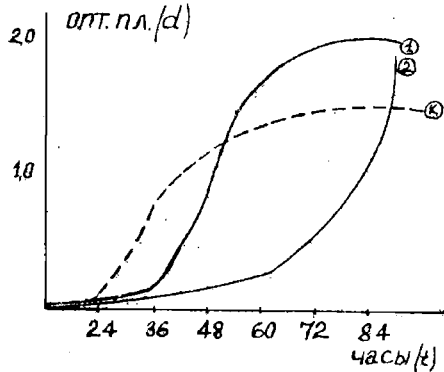
Так как кривые отдельных штаммов этих групп и кривые роста всех штаммов на среде Ридер с аммонийным источником азота отличаются незначительно, на графике I отражено развитие некоторых характерных штаммов дрожжей.

Сравнивая кривые роста на средах с $(NH_4)_2SO_4$ и тимином, видно, что лаг-период на средах с тимином во всех случаях длиннее, чем с аммонийным источником азота. Это может служить доказательством, что ферменты, необходимые для использования тимина принадлежат к индуцируемым ферментам.

Для детального изучения катаболизма тимина дрожжами использовался штамм T_1 . Применяемая методика и результаты описаны в предыдущей работе /9/. Было доказано, что катаболизм тимина начинается постепенным окислением метиловой группы и образованием промежуточных продуктов 5-оксиметилурацила и урацил-5-карбоновой кислоты. В настоящее время нами получены данные, что катаболизм тимина всеми осталь-

График I

Рост диких штаммов дрожжей *Rhodotorula glutinis*
на среде с тиминном как единственным источником
азота



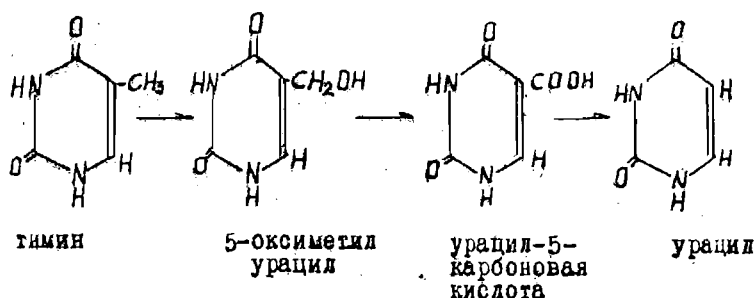
- К - рост штамма T_I на среде с $(NH_4)_2SO_4$
- 1 - рост штамма T_I на среде с тиминном
- 2 - рост штамма T_3 на среде с тиминном

ными штаммами *Rh. glutinis* осуществляется идентично. При развитии всех штаммов на среде с тиминном в качестве единственного источника азота, констатировано накопление в культуральной жидкости 5-оксиметилурацила и урацил-5-карбоновой кислоты.

Высказанная в предыдущей работе возможность дальнейшего декарбоксилирования урацил-5-карбоновой кислоты с образованием урацила, доказана, используя суспензии отмытых клеток. Дрожжи выращивались на среде с тиминном как единственным источником азота. Отмытая суспензия клеток инкубировалась с урацил-5-карбоновой кислотой. На хроматограммах инкубата обнаружено два УФ лучей поглощающих пятна A_1 - остаток урацил-5-карбоновой кислоты и соединения A_2 , которое идентифицировано как урацил.

Таким образом катаболизм тимина *Rh. glutinis* осущест-

вдается по следующей схеме:



В ы в о д ы

1. Дрожжи *Rhodotorula glutinis* (Fres) Harrison широко распространены в разных природных субстратах.
2. Эти дрожжи хорошо используют тимин как единственный источник азотного питания и катаболизм его осуществляется по новому пути через стадию урацила.

Л и т е р а т у р а

1. F. Di Carlo, A.S. Schultz, D.K. McManus. The assimilation of nucleic acid derivatives and related compounds by yeasts. *J. Biol. Chem.*, 1951, 189, 151.
2. F. Di Carlo, A.S. Schultz, A.M. Kent. On the mechanism of pyrimidine metabolism by yeasts. *J. Biol. Chem.* 199, 333, 1952.
3. T.A. La Rue, F.T. Spencer. The utilization of purines and pyrimidines by yeasts. *Canad. J. Microbiol.*, 1968, 14, 79.
4. Д.Я. Вулф, С.Р. Вилко. Использование пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеозидов как единственного источника азота дрожжами родов *Candida* и *Torulopsis*. В настоящем сборнике.

5. M.Cl.Piret, R.Crokaert, J.Christophe. La catabolisme reductif de l'uracile chez *Torulopsis utilis*. *Ann.Intern.Physiol,Biochem*, 1964, 72, 257.
6. M.Kulhanek, E.Svatek, M.Tadra. Microbiological decarboxylation of orotic acid to uracil. *Folia microbiol.*, 1965, 10, 142.
7. J.Lodder, N.J.F.Kreger van Rij. The yeasts. Amsterdam, 1952.

8. Е.Н.Одинцова. Микробиологические методы определения витаминов. М., 1959.
9. М.Я.Витол, С.Р.Вилкс, И.М.Забаровска, Х.А. Мауриня. Трансформация тимина дрожжами *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison, Доклады АН СССР. 1970, 192, 908.
10. J.Ruinen, M.H.Deinema, G.van der Scheer. Cellular and extracellular structures in *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula* species. *Canad.J.Microbiol.*, 1968, 14, 1133.
11. A.Lund. Studies on the ecology of yeasts, Copenhagen, 1954.
12. M.Ingram. Yeasts in food spoilage. "The chemistry and biology of yeasts" edd.by A.H.Cook, 1958, New York.
13. I.F.Spencer, P.A.Gorin, N.R.Gardner. Yeasts isolated from Saskatchewan river (Canada). Third international symposium on yeasts, Delft, Hague, 1969.
14. M.Feo. 262 yeast strains of human origin isolated in Caracas, Venezuela, Third international symposium on yeasts, Delft, Hague, 1969.

О.А. Мильштейн, С.Р. Вилкс, А.Я. Карпле

ХАРАКТЕР УТИЛИЗАЦИИ ДРОЖЖАМИ *Candida utilis* АДЕНИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ ЕДИНСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА АЗОТА

Некоторые дрожжи могут использовать производные нуклеиновых кислот в качестве единственного источника азота /1, 5, 6/. При этом в окружающей среде растущих дрожжей происходят процессы катаболизма, а с другой стороны утилизация введенного соединения.

Одновременное исследование деталей и особенностей использования дрожжами азотистых оснований практически не освещено в литературе.

В настоящем сообщении представлены данные об особенностях использования аденина и его производных дрожжами *Candida utilis*.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы

В работе были использованы дрожжи *Candida utilis*, не нуждающиеся в источниках витаминов. Для культивирования дрожжей использовалась среда Ридер. При использовании азотистых оснований в качестве единственного источника азота они вводились в среду вместо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве 0,1%. Засевным материалом служила 48 часовая культура дрожжей, выращенных на косом сусло-агаре. В питательную среду вносили 0,2 мл дрожжевой суспензии (0,2 единицы оптической плотности по ФЭКУ).

В качестве единственных источников азота были использованы аденин, гипоксантин, ксантин, мочевая кислота, аденозин, АТФ, АДФ, АМФ.

Полученные результаты сравнивались с данными, полученными на средах $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. О способности дрожжей размножаться в данной среде судили по оптической плотности культуры, определяемой ФЭК М-56.

Преобразование в среде введенных соединений исследовали методом бумажной хроматографии. Экстракцию внутриклеточных

свободных оснований, нуклеозидов и нуклеотидов проводили согласно описанным методам /2,6/. Экстрагированные основания и нуклеозиды идентифицировали методом бумажной хроматографии, нуклеотиды - на анионите Dewex Ix10 (200-400 меш), применяя элюирующие растворы по Bergkvist /3/. Об утилизации пуриновых соединений из культуральной среды судили также по изменению оптической плотности при длине волны, соответствующей максимуму адсорбции искомого соединения. Используемые соединения (Neopal) за исключением АМФ, были хроматографически чистые. АМФ содержал следы аденина и аденозина.

Р е з у л ь т а т ы и и х о б с у ж д е н и е

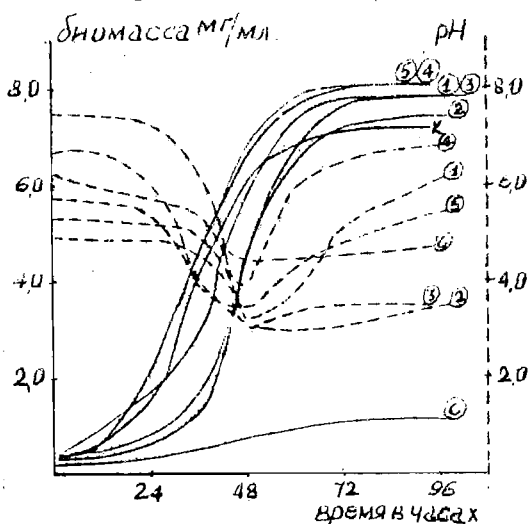
При введении в среду в качестве единственного источника азота аденозина, аденина, гипоксантина, ксантина, мочевой кислоты было обнаружено, что дрожжи одинаково хорошо растут в этих условиях.

В этих условиях был отмечен незначительный рост *Candida utilis* на среде с АМФ. Однако в этом случае нельзя исключить влияние аденина и аденозина, которые обнаруживались в исходном соединении. Не наблюдалось никакого роста дрожжей при использовании в качестве источника азота АТФ и АДФ. Введенные соединения катаболизировались по тривиальной схеме. В то же время надо отметить, что нам не удалось обнаружить метаболитов всех этапов катаболизма аденина. В таблице № I приведены данные хроматографического исследования сред культивирования. Данные соответствуют концу экспоненциальной фазы роста дрожжей.

На рисунке 2 отражена интенсивность убыли аденина из среды, в которой растут дрожжи *Candida utilis*. Как видно из рисунка максимальная утилизация аденина совпала с периодом интенсивного роста дрожжей.

Рис. I

Рост *Candida utilis* на средах, содержащих различные источники N



— динамика изменения биомассы
 - - - динамика изменения рН культуральной среды при использовании в качестве единственного источника

- | | | | |
|---|--------------|---|-----------------|
| 1 | аденина | 4 | мочевой кислоты |
| 2 | гипоксантина | 5 | аденозина |
| 3 | ксантина | 6 | АМФ |

Таблица I

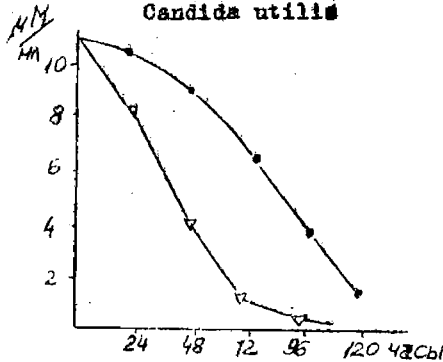
Катаболизм аденина и его производных
дрожжами *Candida utilis*

Обнаруживаемые продукты	Источники азота	Адено-зын	Аденин	Гипоксантин	Ксантин	Мочевая кислота
Аденин		+	+			
Гипоксантин		+	+	+		
Ксантин					+	
Мочевая кислота					+	+
Аллантоин						+
Мочевина					+	+

± - продукты катаболизма мочевой кислоты обнаруживались лишь в начальный период культивирования.

Рис. 2

Изменение содержания аденина в среде при развитии *Candida utilis*



- Динамика изменений у неинкубированных дрожжей.
- △- Динамика изменений у преинкубированных дрожжей.

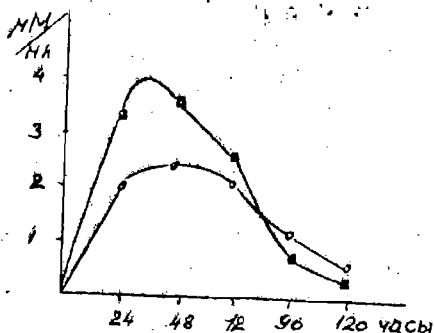
При росте в этой же среде дрожжей, преинкубированных с аденином убыль его из среды была более выражена.

Образующийся при этом гипоксантин исчезает из среды в течение экспоненциальной фазы развития дрожжей *Candida utilis*.

Развитие преинкубированных с аденином дрожжей приводит к меньшему накоплению гипоксантина в среде. Эти данные совместно с результатами изменения концентрации аденина в среде позволяют сделать предположение, что преинкубированные с аденином дрожжи интенсивней аккумулируют, а выращенные без преинкубирования интенсивней катаболизируют вводимый аденин.

Рис. 3

Изменение гипоксантина в среде с развивающимися *Candida utilis* на среде с аденином, как источником азота

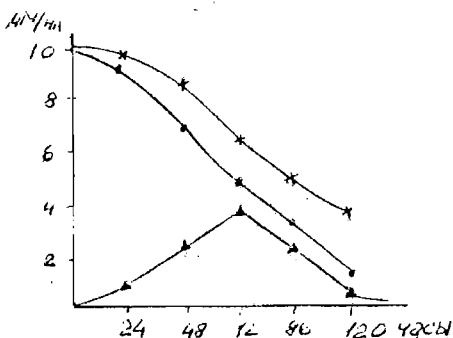


— — — изменение в среде с преинкубированными дрожжами

- - - изменения, вызванные непреинкубированными дрожжами

Рис. 4

Динамика использования *Candida utilis* гипоксантина и ксантина



- . - изменение содержания в среде гипоксантина
- x - изменения содержания ксантина
- ▲ - изменение содержания мочевой кислоты

В то же время различие в количестве накапливаемого гипоксантина может заключаться в различной интенсивности поглощения клетками образовавшегося соединения. В связи с этим следует отметить, что нам не удалось обнаружить один из конечных продуктов катаболизма аденина — мочевую кислоту. Эти данные свидетельствуют о том, что катаболизм гипоксантина происходит интрацеллюлярно.

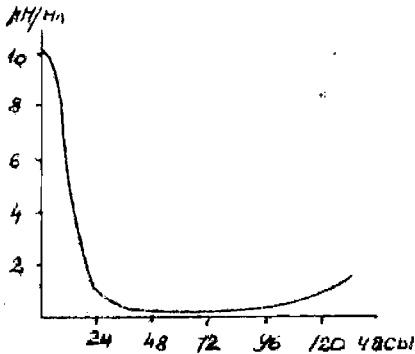
Вводимые в качестве единственного источника азота гипоксантин и ксантин исчезали из среды после некоторого лаг-периода (рис. 4).

В результате катаболизма ксантина в среде обнаружилась мочевая кислота и в конце экспоненциальной фазы обнаруживалась мочевины.

Мочевая кислота как единственный источник азота интенсивно используется и без лаг-периода (рис. 5).

Рис. 5

Утилизация *Candida utilis* мочевой кислоты, использованной в качестве источника N



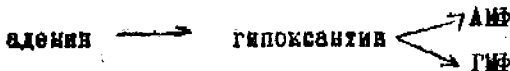
Продукт катаболизма в среде обнаруживается лишь в начальный период роста дрожжей.

В дрожжевых клетках, растущих на аденине, в течение всего срока наблюдения обнаруживалось это соединение.

Максимум его накопления совпадал с наиболее интенсивной утилизацией аденина из среды (рис. 6).

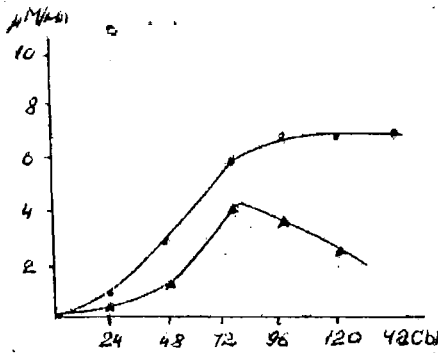
Одновременно с аденином в клетках дрожжей обнаруживался гипоксантин, количество которого практически не изменялось в течение времени наблюдений.

Необходимо отметить, что в клеточном экстракте дрожжей, выращенных на среде с NH_4^+ свободными основания не обнаруживались. Одним из возможных путей участия аденина в биосинтезе азуклеотидов является его превращение по следующей схеме:



или непосредственное присоединение рибозы - 5-фосфат при участии рибозилпирофосфорилазы. В любом случае экзогенный аденин оказывает влияние на количественный и качественный

Изменения внутриклеточного содержания аденина и гипоксантина у *Candida utilis* растущей на среде с аденином в качестве источника N.



- · - динамика изменения гипоксантина
- - - динамика изменения аденина

состав нуклеотидного пула культивируемых дрожжей.

Фонд свободных или кислоторастворимых нуклеотидов выращенных на аденине, как единственном источнике азота, мало отличался от такого у дрожжей, выращенных на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /4/.

Дрожжи, выращенные на аденине и преникубированные с ним, содержат в два раза больше монофосфорилированных нуклеотидов (6,1 мМ/мг с.веса). Среди монофосфорилированных нуклеотидов основной удельный вес занимает ГМФ - 1,7 мМ/мг с.в., АМФ - 1,3 мМ/мг с.в. и ЦМФ - 0,6 мМ/мг с.в. У дрожжей преникубированных с аденином заметно снижается количество трансформированных нуклеотидов.

В ы в о д ы

1. Дрожжи *Candida utilis* интенсивно растут на средах, содержащих в качестве единственного источника азота аденозин, аденин, гипоксантин, ксантин. АМФ используется плохо, АДФ и АТФ - не используются.
2. В среде культивирования не обнаружены конечные продукты катаболизма аденина и гипоксантина.
3. Аденин и гипоксантин во время культивирования обнаруживаются в дрожжевых клетках. При этом внутриклеточная концентрация гипоксантина не изменяется.
4. У дрожжей *Candida utilis* выращенных на аденине преобладают монофосфорилированные нуклеотиды, в том числе: АМФ, ГМФ и ЦМФ.

Л и т е р а т у р а

1. Витол М.Я., Вилко С.Р., Забаровская И.М., Мауриня Х.М. Трансформация тимина дрожжами *Rhodotorula glutinis* (Frea) Harrison. ДАН СССР 1970, 192, 908.
2. С.Э. Мансурова. Диссертация. М., 1966.
3. H. Bergqvist. The Acid-soluble Nucleotides of Wheat Plants. Acta Chem. Scand. 1956; v.10, p 1303-1316.
4. D. Gilbert, Yemm E. Soluble Nucleotides and Nucleotide-Amino-Acid Compounds of yeasts. Nature, 1958, v.182, p. 1746.
5. Larue T.A., Spencer J.F. The Utilization of Purines and Pyrimidines by Yeasts. Canad. J. Microbiol. 1968, v. 14, p. 79.
6. Roush A.H., Questiaux L.M., Donnas A.S. The active Transport and Metabolism of Purines in the yeasts *Candida utilis*. J. Cell Compar. physiol. 1959, v. 54, p. 275.

М.Я.Витол, Ф.Х.Гайнуллина,
Н.Д.Маркелова, И.Б.Лещинская

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РНК СПОРООБРАЗУЮЩИМ МИКРООРГАНИЗМОМ *Bacillus subtilis*

Расщепление высокомолекулярных нуклеиновых кислот в основном изучено при помощи очищенных и выделенных ферментов /1/, однако очень мало уделено внимание вопросу использования и превращения нуклеиновых кислот под влиянием развивающихся микроорганизмов. Разложение нуклеиновых кислот под влиянием микроорганизмов осуществляется в природных субстратах, как например, в водных бассейнах и в почве. В настоящей работе исследовано использование РНК спорообразующим микроорганизмом *Bac. subtilis*, а также изучено динамика в культуральной жидкости при развитии бактерий на средах содержащих РНК.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Исследования проводили с музейной культурой *Bac. subtilis* 13 К, у которого ранее была обнаружена внеклеточная нуклеазная активность. /2/.

Выращивание микроорганизмов осуществляли на основе среды следующего состава (в процентах):

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 0,003
$FeCl_3$	- 0,001
Глицерин	- 0,4
Янтарная кислота	- 0,1
Дрожжевой автолизат	- 0,01

(можно заменить смесь микроэлементов)

К основе добавляли РНК, пуриновое или пиримидиновое производное, $(NH_4)_2SO_4$ или CH_2PO_4 в зависимости от целей опыта. рН доводилась при помощи NaOH до 7,2. РНК, пуриновое или пиримидиновое производное добавляли в стерильной среде, после чего среду доводили до кипения. Выращивание микроорганизмов, определение рН среды, биомассы, выделение и определение химической структуры соединений осуществ-

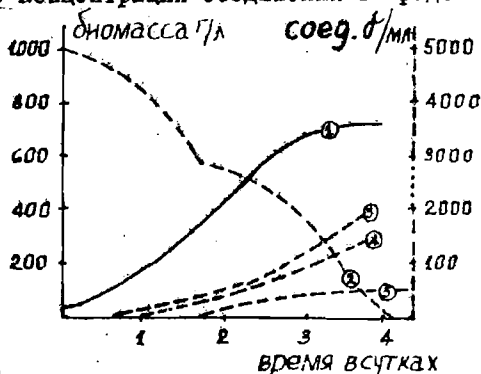
вляя по описанной методике /3/. Количество РНК в среде определяли при помощи метода бумажной хроматографии в системе изопропанол-вода в соотношении 7:3. Нуклеиновая кислота, которая после хроматографического разгона остается на старте, элюировалась водой и пересчет на количество РНК проводился по стандартной кривой, учитывая абсорбцию при 262 мкм в щелочной среде. Экстрацеллюлярная нуклеазная активность проверялась по методу Джеффриса в модификации Юсуповой /2,4/.

Результаты и их обсуждение

Bac. subtilis обладает способностью развиваться на простых синтетических средах с неорганическим источником азотного питания. При замене в синтетической среде $(NH_4)_2SO_4$ на высокомолекулярную РНК, служащей в качестве единственного источника азотного питания, развитие культуры обеспечивается (рис. 1).

Рис. 1

Использование РНК в качестве единственного источника азота и изменение концентраций соединений в среде



Среда: Основа среды + KH_2PO_4 0,1% + РНК 0,5%

1 Биомасса

3 урацил

2 РНК

4 типоксантин

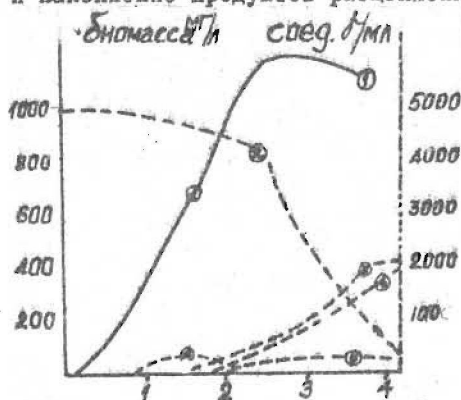
5 ксантин

также с успехом можно заменить неорганический источник фосфорного питания - KH_2PO_4 на РНК. В связи с тем, что нами применялась тщательно очищенная и проверенная РНК, уже по данным развития *Bac. subtilis* на выше указанных средах, можно сделать заключение, что этот микроорганизм

эффективно использует РНК в качестве единственного источника азотного либо фосфорного питания. Для использования РНК в качестве основных источников питания необходимо осуществить сначала расщепление этого соединения до низкомолекулярных производных. Известно, что в первую очередь свое действие на РНК должны проявить рибонуклеаза. В Казанском государственном университете было установлено, что при выращивании на сложной среде *Bac. subtilis* 13 К обладает РНК-азной активностью /2/. Как и следовало ожидать, по данным наших физиологических экспериментов, микроорганизм обладает также РНК-азной активностью при выращивании на простых синтетических средах (табл. I).

Рис. 2

Развитие бактерий на полной минеральной среде, расщепление РНК и накопление продуктов расщепления



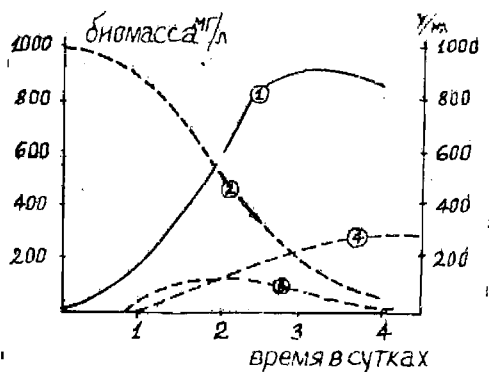
Среда: основа среды + $(NH_4)_2SO_4 - 0,1\%$ + $KH_2PO_4 - 0,1\%$ + РНК 0,5%

- | | | | |
|---|----------|---|-------------|
| 1 | биомасса | 4 | гипоксантин |
| 2 | РНК | 5 | ксантин |
| 3 | урацил | 6 | АМФ |

При количественном изучении накопления низкомолекулярных пуриновых и пиримидиновых соединений установлено, что при расщеплении РНК в более высоких концентрациях накапливается только гипоксантин и урацил. Принципиальной разницы между накоплением низкомолекулярных соединений пурина и пиримидина при использовании РНК в качестве единственного источника азотного либо фосфорного питания нами не отмечено. В случае развития микроорганизмов в среде, которая полностью обеспечивает развитие микроорганизмов, при добавлении РНК также происходит ее расщепление. В отличие от случаев, когда РНК служит в качестве единственного источника азотного либо фосфорного источника питания, в среде накапливается также аденозинмонофосфат, а расщепление РНК более сдвинуто к стационарной фазе развития культуры.

Рис. 4

Использование УМФ в качестве единственного источника фосфора и динамика соединений



Среда: Основа среды + УМФ - 0,1% + $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1%
 1 биомасса 3 урацил
 2 УМФ 4 урацил

Как и следовало ожидать *Bac. subtilis* хорошо использует пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды в качестве основных источников питания (рис. 3., рис. 4).

При этом АМФ может быть использован либо в качестве источника азотного, либо фосфорного питания, однако уридилловая кислота может использоваться только в качестве источника фосфорного питания. Учитывая, что основным продуктом, накапливающимся при использовании АМФ является гипоксантин, можно сделать вывод, что свои потребности в качестве азота при развитии на АМФ содержащих средах бактерии удовлетворяют за счет свободной аминогруппы аденинового цикла. Поскольку в уридилловой кислоте свободная аминогруппа отсутствует, она не используется в качестве источника азотного питания и в среде накапливается урацил.

Как видно из рис. 3 и 4 *Bac. subtilis* обладает выраженной дефосфорилазной и нуклеазидазной активностью. Это объясняет, почему в случае расщепления высокомолекулярной РНК в значительных количествах в среде не наблюдается накопления нуклеотидов и нуклеозидов.

В ы в о д ы

1. *Bac. subtilis*, выделяющий экстрацеллюлярную РНК-азу использует РНК в качестве единственного источника фосфорного или азотного источника питания.
2. Во время развития бактерий на РНК содержащих средах наблюдается накопление низкомолекулярных пуриновых и пиримидиновых соединений.

Л и т е р а т у р а

1. В.С. Шапот . . . Нуклеазы. Изд. "Медицина", М., 1968.
2. Лецинская И.Б., Мсупова Д.В. Сравнительное изучение нуклеазной активности различных видов сапротивных бактерий. Микробиология, 1964, 35, 224.
3. М.Я. Витол. Параллельные пути катаболизма урацила микробактериями. В настоящем сборнике.

В. Х. Вольский, Л. Ф. Максимова, М. Я. Витол, А. А. Ласмане

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ НЕКОТОРЫМИ ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ

В отличие от пиримидиновых соединений использование микроорганизмами пуриновых производных, а именно адениновых нуклеотидов в качестве основных источников питания мало изучено.

Мы поставили перед собой следующие задачи:

1. Изучить возможность применения метода реплик для предварительного отбора микроорганизмов, использующих адениновые нуклеотиды.

2. Выяснить распространение способности среди различных почвенных микроорганизмов использовать адениновые нуклеотиды в качестве источников азотного либо фосфорного питания.

Для получения предварительных данных о распространении свойств использования адениновых нуклеотидов среди различных групп почвенных микроорганизмов (бактерий, грибов, актиномицетов) не требующих для своего развития сложных питательных сред, мы применяли метод реплик.

Выделение почвенных микроорганизмов производили на синтетической агаризованной среде "А" следующего состава (в процентах)

K_2HPO_4	- 0,1
KH_2PO_4	- 0,05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 0,02
$FeCl_3$	- 0,001
янтарная кислота	- 0,1
глицерин	- 0,5
$(NH_4)_2SO_4$	- 0,1
агар-агар	- 2

смесь микроэлементов* - 1 мл/л, pH среды 7,0.

Среду стерилизовали в автоклаве при 1 атм в течение 20 минут. Почвенные взвеси готовили на стерильной водопроводной воде в трех разведениях 1:1000, 1:10000, 1:100000.

* Смесь микроэлементов содержит следующие ионы:
 Mn^{2+} Zn^{2+} Cu^{2+} MoO_4^{2-} VO_3^{3-}

Выращивание микроорганизмов длилось 3-4 дня при 28°C. Затем просматривали выросшие колонии микроорганизмов и отбирали из тех разведений одно с более оптимальным распределением колоний по поверхности среды.

Для опытов с неагаризованными средами, в качестве посевного материала брали суточные культуры бактерий, выращенные на МПА и 5 суточные колонии актиномицетов, выращенные на крахмало-аммиачной среде следующего состава (в процентах)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	- 0,1
K_2HPO_4	- 0,1
MgSO_4	- 0,03
NaCl	+ 0,05
крахмал-растворимый	- 1
агар-агар	- 2
дистиллированная вода до 1 л	

Исходное рН 7,0.

Выращивание актиномицетов на жидких синтетических средах осуществляли следующим образом. Среда наливалась в 250 мл колбы Эрленмейера по 30 мл. После стерилизации и добавления посевного материала, колбы помещались на качалку при 28°C, работающую в режиме 150 об/мин. Все среды, содержащие производные аденозина, стерилизовались пропусканием через бактериальные фильтры.

Пробы отбирались стерильно по ходу развития культур через 48 часов. Перед серийным опытом методом реплик, колонии перепечатывали на основу синтетической среды "Б" с различными концентрациями АМФ, АДФ, АТФ, вводимых в качестве единственного источника азотного питания. Для переноса колоний методом реплик использовали стерильный бархат.

Основа синтетической среды "Б" (в процентах)

K_2HPO_4	- 0,1
KH_2PO_4	- 0,05
MgSO_4	- 0,02
янтарная кислота	- 0,1
глицерин	- 0,5

агар-агар - 2
смесь микроэлементов I мл/л

Исходное pH среды 7,0.

Одновременно с этим колонии были перепечатаны на основу синтетической среды "В" для проверки использования АМФ, АДФ, АТФ в качестве единственных источников фосфорного питания.

Основа синтетической среды "В" (в процентах)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1
 MgSO_4 - 0,02

янтарная кислота - 0,1

глицерин - 0,5

агар-агар - 2

смесь микроэлементов I мл/л

Исходное pH среды 7,0.

Для выяснения необходимых концентраций пуриновых соединений в синтетических средах, позволяющих осуществлять удовлетворительный учет использования их в качестве источника питания, предварительные опыты ставили с различными концентрациями АМФ, АДФ, АТФ.

Основа среды "Б" и основа среды "В" содержали следующие концентрации указанных трех пуриновых соединений: 0,01%, 0,025%, 0,05%, 0,1% и 0,2%.

После произведения отпечатков выросших колоний со среды А на среды "Б" и "В" с вышеуказанными концентрациями АМФ, АДФ, АТФ, чашки помещались в термостат при 28°C. В качестве контрольных опытов служили отпечатки на основе сред "В" и "С" без адениновых производных. Через 3-5 дней делался учет развития бактериальных колоний на всех средах с различными концентрациями этих соединений. Этот опыт показал, что удовлетворительное развитие колоний происходит при введении в основу синтетической среды "Б" 0,05% аденозинновых нуклеотидов, а в основу синтетической среды "В" 0,025%.

При указанных концентрациях микроорганизмы, способные использовать адениновые нуклеотиды в качестве источников

азота или фосфора, развиваются достаточно хорошо, чтобы отличить их от тех колоний микроорганизмов, которые не способны использовать указанные соединения.

Увеличение концентраций адениновых производных выше 0,05% в основе среды "Б" и выше 0,025% в основе среды "В" значительно не увеличило размеры выросших колоний, перенесенных методом отпечатков, однако заниженные концентрации, значительно уменьшили их размеры, приближая к размерам соответствующих контрольных сред (основа среды "Б" и "В") не содержащих адениновых нуклеотидов.

Чашечный метод отбора, судя по росту колоний, показал, что бактериальный штамм 23 использует все адениновые нуклеотиды в качестве единственного источника азотного или фосфорного источника питания, штамм 134 не способен в аналогичных условиях использовать эти соединения вообще.

Колонии актиномицетного штамма 89 не развиваются на чашках с адениновыми нуклеотидами в качестве азотного источника или фосфорного источника питания, однако штамм 563 способен развиваться на средах, где адениновые нуклеотиды служат в качестве единственного источника азотного либо фосфорного источника питания.

Для выяснения достоверности отбора, активных микроорганизмов по указанной методике, нами отобраны два характерных штамма бактерий (штамм 23 и 134) и актиномицетов (штамм 563 и 89).

Данные по развитию отобранных микроорганизмов на жидких синтетических средах подтверждают предварительные результаты полученные при развитии микроорганизмов на твердых селективных средах в случае пересева колоний методом реплик.

23 штамм бактерий и 563 штамм актиномицета, отобранные на твердых селективных средах как культуры, способные использовать производные аденозина, подтвердили эти свойства при более тщательной проверке на жидких синтетических средах. Все АМф, АДф и АТф, как и следовало ожидать, хорошо поддерживают развитие штамма 23 и 563. Штаммы 134 и 89, практически не развивавшиеся на твердых селективных средах "Б" и "В" с АМф, АДф и АТф. Они также при дополнительной проверке не использовали эти соединения на жидких средах

Таблица I

Развитие отобранных штаммов бактерий и актиномицетов на жидких синтетических средах, содержащих АМФ, АДФ и АТФ

Культуры	Время в сутках	Биомасса					
		Мг/л					
		Основа среды В +			Основа среды Б +		
	АМФ	АДФ	АТФ	АМФ	АДФ	АТФ	
Штамм № 23 (бактерии)	1	250	370	500	620	750	650
	2	1050	1120	1245	1300	1400	1370
	3	1200	1200	1255	1350	1320	1200
	4	1150	1050	900	1200	1150	1165
Штамм № 184 (бактерии)	1	25	20	25	25	20	25
	2	84	48	102	125	40	63
	3	85	96	85	112	105	84
	4	81	90	85	110	98	80
Штамм № 563 (актиномицеты)	1	52	34	83	120	20	100
	2	110	210	332	1150	250	400
	3	380	590	580	700	550	900
	4	720	1000	978	1150	1000	1050
	5	1210	1820	1380	1160	1050	1080
	6	1340	1829	1592	1010	1100	1112
	7	1340	1820	1500	1000	1101	1110
Штамм № 89 (актиномицеты)	1	20	20	15	15	20	20
	2	33	28	31	18	23	29
	3	40	30	40	20	29	36
	4	41	31	43	24	33	45
	5	40	30	42	25	33	50
	6	38	29	42	23	32	50
	7	38	28	40	22	32	45

(табл. 1).

В дальнейшем мы применяли метод реплик для перенесения микроорганизмов на элективных средах с выше подобранными оптимальными концентрациями адениновых нуклеотидов, в целях выяснения распространения свойств использовать адениновые производные в качестве основных источников питания. Сравнивая рост микроорганизмов на этих средах, учитывали какая из сред может поддерживать развитие микроорганизмов.

Методом реплик была проверена возможность использовать АМФ, АДФ, АТФ в качестве основных источников питания у микроорганизмов, выделенных из 50 образцов оранжерейных почв Ботанического сада ЛГУ. Таксономическое подразделение микроорганизмов к различным группам осуществлено путем микроскопии и учитывая характеристику выросших колоний.

В общем итоге получены данные по 2 тысячам культур, из которых: 1606 культур отнесено к бактериям, 163 культуры к актиномицетам и 231 культура к грибам. Результаты опыта по использованию питательных сред этими микроорганизмами представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что большинство из выделенных культур почвенных бактерий, актиномицетов и грибов, способных развиваться на простой синтетической среде А, способны использовать АМФ, АДФ, АТФ как в качестве фосфорного так и в качестве азотного источника питания.

Судя по полученным данным эта способность у грибов распространена шире, чем у актиномицетов и бактерий. Как правило в наших опытах выявлено, что микроорганизмы, способные использовать адениновые нуклеотиды в качестве азотного источника питания, используют их также в качестве источника фосфорного питания.

Обсуждение результатов

Как показали опыты по выращиванию культур и перенесению отпечатков на элективные среды методом реплик, этот метод может быть применен для отбора микроорганизмов, способных использовать производные пурина в качестве основных источников питания.

Таблица 2

Распространение свойства среди различных таксономических групп почвенных микроорганизмов использовать адениновые нуклеотиды в качестве основного источника питания

Микроорганизмы	Общее число проверенных культур, выделенных на среде "А"	Развитие штаммов на средах (из общего количества в %)					
		ОСНОВА СРЕДЫ Б +			ОСНОВА СРЕДЫ В +		
		АМФ	АДФ	АТФ	АМФ	АДФ	АТФ
Бактерии	1606	82	81	83	91	93	94
Актиномицеты	168	78	78	74	82	83	82
Микроскопические грибы	231	96	97	97	98	96	98

Применяя эту методику, необходимо учитывать влияние возможных загрязнений пуриновых соединений другими азот- и фосфор содержащими органическими и неорганическими примесями, которые в свою очередь могут обеспечить развитие микроорганизмов. Поэтому следует применять тщательно очищенные соединения, не вводить завышенные концентрации пуриновых производных, так как это увеличит количество посторонних примесей. Кроме того, азот и фосфор могут быть перенесены на безазотистую и безфосфорную среду также бархатом, из синтетической среды "А", но это, как правило, обеспечивает незначительный рост. Поэтому при учете возможности использования адениновых производных при помощи метода чашечных реплик всегда надо учитывать также разницу в величине колоний, выросших на соответствующих средах, содержащих аденозиновые производные и на контрольных средах без производных аденина. Несмотря на все соблюдаемые меры, незначительный рост на контрольных средах (основа среды "Б" и основа среды "В" без АМФ, АДФ, АТФ) наблюдался. Как и следовало ожидать, рост сильнее проявляется на контрольных средах без минерального фосфора (основа среды "В" без нуклеотидов). Это объясняется тем, что развитие бактерий может быть обеспечено меньшим содержанием фосфора чем азота, который всегда в ничтожных количествах встречается как загрязнение обычных химических реактивов. Кроме того бактерии, выросшие на полных средах, в своих клетках содержат запас азотных и фосфорных соединений, которые в свою очередь обеспечивают незначительное развитие бактерий на средах без азота и фосфора.

В этой работе не обсуждается вопрос о распространении свойств использовать АМФ, АДФ, АТФ среди различных видовых групп микроорганизмов, так как такой учет не проводился. Данные касаются возможности использования адениновых производных среди общего количества обитающих в почве микроорганизмов, не требующих для своего развития сложных синтетических сред.

В ы в о д ы

1. Для быстрого и эффективного выявления и выделения различных микроорганизмов, способных использовать пуриновые соединения в качестве основных источников питания, можно применять метод реплик с выращиванием микроорганизмов на соответствующих селективных средах.
2. Большинство выделенных нами штаммов почвенных микроорганизмов могут хорошо развиваться на средах с АМФ, АДФ, АТФ в качестве основных источников азотного либо фосфорного питания.
3. Все проверенные в наших опытах штаммы микроорганизмов, использующие АМФ, АДФ, АТФ в качестве единственного источника азотного питания, используют указанные соединения, также в качестве источника фосфорного питания.

Д.Э.Поммере, А.К.Вавере, М.Я.Битол

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Наряду с бактериями грибы также обладают экзогенными ферментами, способными активно разрушать нуклеиновые кислоты /1,6/, которые вместе с растительными и животными остатками попадают и почву и водные бассейны /2/. Таким образом, образующиеся низкомолекулярные соединения пурина и пиримидина подвергаются дальнейшему разложению микроорганизмами, которые используют последние для обеспечения жизнедеятельности, и подвергая указанные соединения дальнейшей минерализации.

На это указывают встречающиеся данные, что грибы могут хорошо использовать пуриновые соединения в качестве источников азотного питания. /3,4,5,7/.

В настоящей работе изучена возможность использовать некоторыми грибами низкомолекулярные пуриновые и пиримидиновые производные в качестве единственных источников азотного питания.

Для облегчения в дальнейшем хроматографических исследований, грибы выращивались на модифицированной среде Чапека с редуцированными концентрациями питательных веществ:

Сахароза	- 1%
K_2PO_4	- 0,1%
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 0,02%
KCl	- 0,05%
FeCl_3	- следы
Дрожжевой автолизат	- 0,01 %
Пуриновое или пиримидиновое соединение	- 0,2%

Использовались следующие соединения: аденин, аденозин, гипоксантин, мочевиная кислота, АМФ, АДФ, АТФ, барбитуровая кислота, оротовая кислота, тимин, урацил, уридин и УМФ. Пуриновые и пиримидиновые производные добавлялись после стерилизации основной среды. рН среды доводилось до 6,0 при помощи раствора NaOH и среду снова частично стерилизовали

доведением до кипения. Микроорганизмы выращивались в колбах Эрленмейера объемом на 250 мл, которые содержали 50 мл среды. После микрозасева спорами, инкубацию проводили в стационарных условиях при температуре 28°.

Определение химической структуры соединений, накапливающихся в культуральной жидкости, проводили путем прямого сравнения с веществами заведомо известной структуры по описанной методике /8/.

Результаты

В экспериментах использованы следующие музейные культуры микроскопических грибов: *Aspergillus niger* ВКМ-733, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium ranum*, *Cladosporium sphaerosporum*, *Neurospora crassa*, *Verticillium album*, *Trichoderma lignorum*.

Все культуры способны развиваться на модифицированной среде Чапека, используя сульфат аммония в качестве источника азотного питания. Развитие грибов на средах с различными источниками азотного питания показано на табл. I.

Все культуры в качестве единственного источника азотного питания хорошо используют пуриновые соединения, структура которых представляет либо основание, либо нуклеозид или нуклеотид. Как правило, пириимидиновые производные не поддерживают развитие изученных грибов, либо поддерживают очень слабо. При сравнении возможности использования двух пириимидиновых оснований - урацила и тимина, установлено, что в отличие от урацила, тимин также, как оротовая и барбитуровая кислота в условиях эксперимента не обеспечили развитие ни одной из десяти исследованных культур грибов.

Penic. chrysogenum хорошо использующий уридин-5^I-монофосфат, также хорошо использует уридин и урацил. Все грибы хорошо использующие АМФ, хорошо используют аденозин и аденин. Эти результаты согласуются с биохимическими данными,

Биомасса грибов на различных синтетических средах (мг/л)
через 8 суток культивирования

Таблица I

Основа модифицированной среды Чапека +

Соединения	АМФ	Аденозин	Аденин	Гипоксантин	Мочевая кислота	УМФ	Урацил	Урацил	Тимин	Оротовая кислота	Барбитуровая кислота	(NH ₄) ₂ SO ₄	без контроля
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Aspergillus niger</i> ВКМ-733	2533	1980	2113	2164	2601	130	150	343	25	15	18	2468	23
2. <i>Asp. niger</i>	2713	2143	2512	1850	2432	93	86	283	26	21	28	2700	26
3. <i>Asp. terreus</i>	1463	1321	1512	1850	2432	19	18	52	12	18	13	1510	13
4. <i>Asp. oryzae</i>	1805	1732	1820	2100	1920	118	320	670	26	24	23	2100	25
5. <i>Asp. ochraceus</i>	1543	1721	1656	1812	1715	15	13	15	14	10	12	1680	15
6. <i>Penic. notatum</i>	2118	2230	1200	1800	1930	18	12	12	18	14	16	3100	16
7. <i>Penic. chrysogenum</i>	2832	2830	2500	2910	2915	150	168	2310	15	18	20	2900	17
8. <i>Cladosp. racem</i>	1420	1420	1430	1113	1250	35	40	220	10	8	7	1320	6
9. <i>Cladosp. sphaerosporum</i>	3210	3308	3380	2800	2518	13	16	32	12	15	14	3120	12
10. <i>Neurospora crassa</i>	1610	1720	1810	1830	1900	16	14	16	18	12	15	1720	15
11. <i>Verticillum album</i>	1210	1312	1114	1412	1500	18	20	18	19	22	23	1510	21
12. <i>Trichoderma lignorum</i>	3160	3280	2810	2910	3320	21	18	22	25	20	16	3216	20

108

о том, что трансформация микроорганизмами нуклеотидов обычно осуществляется через стадию нуклеозидов и свободных оснований с последующим расщеплением пуринового или пиримидинового кольца /9/.

Таблица 2

Обнаруженные соединения, накапливающиеся в культуральной жидкости *Aspergillus niger* ВКМ-733, при использовании производных аденина и их продуктов катаболизма

Основа среды Чапека +	Продукты накапливающиеся в окружающей среде
АМФ	Нет тривиальных продуктов катаболизма
АДФ	- " -
АТФ	- " -
Аденозин	Аденин, гипоксантин, мочевина
Аденин	Гипоксантин, мочевина
Гипоксантин	Мочевина, мочева кислота
Мочевая кислота	Мочевина
Алантион	Мочевина
Алантииновая кислота	Мочевина
Мочевина	-

Дальнейшие исследования нами проводились с культурой *Aspergillus niger* ВКМ-733. Культура, кроме выше рассмотренных соединений, в качестве единственного источника азотного питания хорошо использует также АДФ, АТФ, алантион, мочевину. Во время использования пуриновых соединений и их тривиальных продуктов катаболизма отмечено накопление в культуральной жидкости целого ряда новых соединений, которые представлены в табл. 2. Судя по продуктам, накапливающимися в аденозин содержащих средах и в средах, содержащих дальнейшие тривиальные продукты расщепления пуринового кольца, видно, что катаболизм аденозина *Asp. niger* ВКМ 733 осуществляется по общеизвестной схеме:

Аденозин → аденин → гипоксантин → мочевая
кислота → алантоин → алантоиновая кислота →
мочевина.

Интерес представляет обстоятельство, что во время использования АМФ, АДФ и АТФ не отмечено накопление в культуральной жидкости ни аденозина ни продуктов катаболизма этих соединений, хотя адениновые нуклеотиды из окружающей среды исчезают полностью уже в первой половине логарифмической фазы развития культуры.

Причины ускоренной утилизации и разрушения АМФ, АДФ и АТФ по сравнению с аденином и аденозином требует дополнительных исследований. Явление может быть связано как с вопросом проникновения соединений в клетку, а также со стимулирующим действием увеличенных концентраций адениновых нуклеотидов на катаболические процессы. Не исключена возможность, что катаболизм АМФ, АДФ и АТФ осуществляется также по иным путям - минуя стадий аденозина и аденина.

В ы в о д н

1. Природные низкомолекулярные производные пурина служат отличными источниками азотного питания для всех 12 проверенных культур грибов. Пиримидиновые структуры в качестве единственных источников азотного питания у большинства культур рост не поддерживают или поддерживают слабо.
2. *Aspergillus niger* катаболизирует аденозин по тривиальному пути включающих стадий аденина, гипоксантина, мочевой кислоты, алантоина.

Л и т е р а т у р а

1. М.И.Беляева, И.Б.Лещинская. Нуклеазы микроорганизмов и характер их действия на нуклеиновые кислоты. В сб. "Нуклеазы и некоторые аспекты их применения". Изд. Казанского университета, 1968, 6.

2. М.Н.Бурангулова. Нуклеиновые кислоты почв. В сб. "Биология нуклеинового обмена у растений". Изд. "Наука", М., 1964, 52.
3. F.T.Wolf. Nutrition and metabolism of the tobacco wilt *Fusarium*, Bull.Torrey Bot.Club. 1955, 82, 334.
4. E.Taha, M.Eldin., M.M.Sharabash. Utilization of xanthin by mould fungi. Nature, 1956, 177, 622.
5. A.I.Darlington, C.Scarrocchio, I.A.Peteman. Biochemical and genetical studies of purine breakdown in *Aspergillus*. Nature. 1965, 206, 599.
6. С.И.Безбородова, Л.Б.Базенкова, М.Б.Базенкова. 5^I-фосфодиэстеразы грибов и их свойства. Микробиология, 1968, 37, 581.
7. Ф.Т.Сухенко, Е.С.Погайна. Превращение мочевой кислоты некоторыми грибами. Биохимия. 1958, 23, 185.
8. М.Я.Витол. Параллельные пути катаболизма урацила. В настоящем сборнике.
9. M.Kuckner, C.Westernack. Über neue Arbeiten zur Biosynthese N-heterocyclischer Verbindungen. VII. Bildung und Abbau von Verbindungen mit Pyrimidin-ringsystem. Die Pharmazie, 1967, 34, 181.

Л.Я.Вулф, Е.П.Райпулис, М.К.Тома

ПРИМЕНЕНИЕ N-НИТРОЗО- N -МЕТИЛМОЧЕВИНЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

N-нитрозо- N -метилмочевина относится к веществам - супермутагенам, открытым И.А.Рапопортом в 1948 году /Рапопорт, 1948/. По мутагенному эффекту эти соединения значительно превосходят физические мутагенные факторы /Батошевич, 1965/. В основе мутагенного действия нитрозо- N -метилмочевины - многостороннее действие этого соединения на ДНК: дезаминирование гуанина, аденина, цитозина /Туманов и др., 1966/, метилирование гуанина, а также карбоксилирование некоторых компонентов ДНК /Серебряный и др., 1969/.

Для получения ауксотрофных мутантов N-нитрозо- N -метилмочевина использована в работах с *Chlorella vulgaris* /Хропова, 1966/, *Penicillium Chrysogenum* /Лебедев, 1968/, *Sarium sporotrichioides* /Котик, 1968/.

Для получения ауксотрофных, в том числе дефицитных по пуриновым и пиримидиновым соединениям, мутантов *Saccharomyces cerevisiae* были использованы I и 2% растворы N-нитрозо- N -метилмочевины.

Объект исследования: гаплоидный штамм *Saccharomyces cerevisiae* 15В-П4, полученный из Петергофской генетической лаборатории.

Методика работы: мутагеном обрабатывалась дрожжевая суспензия $10^7 - 10^8$ клеток/мл при pH 6,6. После обработки произведена нейтрализация с I N NaOH. Для определения выживаемости, клетки высевались на полной среде. Контролем служили клетки, выдержанные соответствующее время в физиологическом растворе.

Для выявления ауксотрофных мутантов применен метод реплик на минимальной и полной среде. Дефицитные ростовые факторы мутантов выявились с помощью бумажных дисков, насыщенных витаминами, аминокислотами, азотистыми основаниями.

Полная среда (г/л дист. воды):

пептон	- 10,
глюкоза	- 20,
автолизат дрожжей	- 10,
агар	- 21,
Минимальная среда (г/л дист. воды):	
KH_2PO_4	- 0,87
K_2HPO_4	- 0,12
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	- 1,0
глюкоза	- 10,0
биотин	- 0,2
агар	- 21
смесь микроэлементов	- 10

Под действием 1% раствора N-нитрозометилмочевины выживаемость дрожжей снижается в первые шесть часов обработки и следующие два часа существенно не меняется (таблица I).

Максимум появления ауксотрофных мутантов также достигается при шестичасовой экспозиции клеток с мутагенами и

Таблица I

Действие N-нитрозо- N -метилмочевины на выживаемость дрожжей и образование ауксотрофных мутантов

Концентрация мутагена в %	Время обраб. час.	Выживаемость дрожжей в % x ± m	Ауксотрофные мутанты		
			количество		в %
			в контроле	после обработки мутагеном	x ± m
I	2	98,5 ± 0,85	0	4	0,3 ± 0,01
I	4	90,3 ± 0,85	0	3	0,4 ± 0,02
I	6	37,3 ± 1,41	0	11	2,5 ± 0,74
I	8	36,2 ± 1,44	0	11	2,7 ± 0,82
2	2	11,3 ± 0,46	0	0	0
2	4	0,8 ± 0,14	0	10	34,5 ± 8,58
2	6	0,1 ± 0,05	0	0	0

при дальнейшей обработке не увеличивается. Это косвенно указывает на инактивацию мутагена. Известно, что N-нитрозо-N-метилмочевина в растворе со временем инактивируется, особенно при нейтральном значении pH среды /Бедяк, Сизова, 1968/.

В 2% растворе мутагена инаktivация дрожжей происходит более эффективно. При восьмичасовой обработке погибают все клетки. Инаktivация мутанта не наблюдается. При обработке дрожжей 2% раствором N-нитрозо-N-метилмочевинны мутантов удалось получить только при четырехчасовой экспозиции (выживаемость 0,8%, 34,5 мутантов).

Применение супермутагена- N-нитрозо-N-метилмочевинны позволяет, по сравнению с ультрафиолетовыми лучами, в несколько десятков раз повысить выход ауксотрофных мутантов.

Всего было получено 39 мутантов (таблица 2). Характер ауксотрофности удалось определить у семи мутантов (таблица 2). Остальные мутанты в течении 4 месяцев ревертировали (27 мутантов) или не выжили (5 мутантов).

Таблица 2

Характеристика ауксотрофных мутантов
N-нитрозо-N-метилмочевинной

Концентрация мутагена в %	Время обработки в час	Общее к-во мутантов	Из них в течении 4 месяцев		
			ревертировались	погибли	сохранились *
I	2	4	2	-	2 (изолейцин + лизин; урацил)
6	4 II	3 9	3 -	-	- 2 агритин; тирозин или фенилаланин
2	8 4	II 10	8 5	3 2	- 3 инозит; -аланин; аденин

* указаны необходимые факторы роста отдельных мутантов

В ы в о д ы

1. Получены ауксотрофные мутанты *Saccharomyces cerevisiae* гаплоидного штамма 15В - ПА обработанной I и 2% N-нитрозо-N-метилмочевинной. Для 1% раствора наиболее эффективной экспозицией оказалось 6 часов, а для 2% - 4 часов.
2. Получено 39 ауксотрофных мутантов, 27 из которых ревертировались в течении 4 месяцев.

Л и т е р а т у р а

1. И.А.Рапопорт. Алкилирование геной молекулы. Доклады АН СССР. 1948, 59, 1183.
2. Л.Л.Туманов, А.Е.Бедняк, Н.П.Норенко. Мутагенное действие N-нитрозоалкилмочевин, в сб. "Супермутагены", "Наука", М., 1966.
3. Бартошевич Ю.П. Мутагенный эффект нитрозоалкилмочевин и этилена на обратных мутациях актиномицетов. Доклады АН СССР. 1965, 162, 193.
4. А.М.Серебряный, М.А.Смотряева, К.Е.Круглякова, Л.Н.Матвиенко, Р.Г.Костяновский. Модификация ДНК N-нитрозо-N-метилмочевинной. Тезисы секционных сообщений II Всесоюзного биохимического съезда. 4 секция. Изд. "Фан". Ташуент, 1969, стр. 93.
5. В.И.Хропова. Изменчивость *Chlorella vulgaris* Blijer индуцированное нитрозометилмочевинной. В сб. "Супермутагены". Изд. "Наука", стр. 190, М., 1966.
6. Э.С.Лебедев. Изменчивость ряда признаков у штамма № 195 *Penicillium chrysogenum* под действием N-нитрозо-N-метилмочевинной. В сб. "Специфичность химического мутагенеза", изд. "Наука", М., 1968, 146.

7. А.Н.Котик. Аукографные и морфологические мутанты *Fusarium sporotrichioides* полученные при действии N-нитрозометилмочевины. Генетика. 1969, 4, в: 7, 98.
8. А.Е.Бедняк, Сизова С.Т. Исследования продуктов химического взаимодействия N-нитрозо-N-метилмочевины с компонентами нуклеиновых кислот. Изд. "Наука": М., 1968, 20.

С о д е р ж а н и е

	Стр.
Предисловие	3
X I. М.Я.Витол, Физиологические свойства микобактерий, Я.А.Офкант. Использующих природные пириимидиновые осно- вания в качестве единственного источника органического питания	4
X 2. М.Я.Витол. Параллельные пути катаболизма урацила микобактериями	15
X 3. Д.П.Швачкин, М.Я.Витол, И.К.Епрунка, Л.А.Арманис, А.Я.Лешман. Образование 5-оксиметилпирими- динов при трансформации -(пириимидил-5) аланинов микроорганизмами рода <i>Mycobacterium</i> 24	24
У 4. А.Я.Лешман, И.Я.Раснач, М.Я.Витол, Я.Я.Шлуке, М.Ю.Лидак. Трансформация производных β -(6-аминопуриинил- N_9)- α -аланина микро- организмами рода <i>Mycobacterium</i>	32
X 5. М.Э.Дунцис, М.Я.Витол. Выделение анаэробных микро- организмов, способных превращать экзогенные пуриновые и пириимидиновые соединения	40
6. М.Э.Дунцис, М.Я.Витол. Трансформация производных пурина анаэробными микроорганизмами рода <i>Clostridium</i>	49
7. Л.В.Медведева, М.Я.Витол, В.Х.Вольский. Возможность выделения микроорганизмов на средах с пури- новыми и пириимидиновыми нуклеозидами в ка- честве основного источника питания	60
X 8. С.Р.Вилкс, Л.Я.Булф. Использование пуриновых и пири- имидиновых оснований и нуклеозидов как единст- венного источника азота дрожжами родов <i>Candida</i> и <i>Torulopsis</i>	67
X 9. С.Р.Вилкс, М.Я.Витол, И.М.Пурлаура. Распространение в природных субстратах тимин использующих дрожжей и их метаболические особенности ...	75

- X 10. О.А.Мильштейн, С.Р.Вилкс. Характер утилизации дрожжами *Candida utilis* аденина и его производных, используемых в качестве единственного источника азота 82
- X 11. М.Я.Витол, Ф.Х.Гайнуллина, Н.Ю.Маркелова, И.Б.Лещинская. Использование РНК спорообразующим микроорганизмом *Bacillus subtilis* 91
12. Л.Ф.Максимова, М.Я.Витол, А.А.Ласмане. Использование адениновых нуклеотидов некоторыми почвенными микроорганизмами в качестве основных источников питания 97
13. Д.Э.Поммере, А.К.Бавере, М.Я.Витол. Использование микроскопическими грибами низкомолекулярных пуриновых и пиримидиновых соединений 105
- X 14. Л.Я.Вулф, Е.П.Райпулис, М.К.Тома. Применение N -нитрозо- N -метилмочевины для получения ауксотрофных мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 112

Ученые записки, том 145

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Редактор проф. Х.Мауриня
Технический редактор Е.Безлюдова
Корректор Е.Безлюдова

Редакционно-издательский отдел ЛГУ им. Петра Стучки
Рига 1972

Подписано к печати 19/XII 1971. ЯТ 15028. Зак. № 161.
Ф/б. 60x84/16. Offsetная. Физ.п.л. 7,4. Уч.-и.л. 5,3
Тираж 500 экз. Цена 58 коп.

Отпечатано на ротапринтере, Рига-50, ул.Вейденбаума, 5
Латвийский государственный университет им. П.Стучки

LU bibliotēka



200023644

06

Цена 58 коп.

✓
PI-75
145

Учен. зап. (ЛГУ им. Петра Стучки), т. 145, I-II8.